



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**JOSUÉ ALVES MELO**

**MISTURAS DE ÉSTERES PRODUZIDOS A PARTIR DE  
FONTES ALTERNATIVAS DE TRIACILGLICERÓIS: TEOR DE  
ÉSTERES E CONTAMINANTES**

***MIXTURES OF ESTERS PRODUCED FROM ALTERNATIVE  
SOURCES OF TRIACYLGLYCEROLS: CONTENT OF ESTERS AND  
CONTAMINANTS***

**JOSUÉ ALVES MELO**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MISTURAS DE ÉSTERES PRODUZIDOS A PARTIR DE**  
**FONTES ALTERNATIVAS DE TRIACILGLICERÓIS: TEOR DE**  
**ÉSTERES E CONTAMINANTES**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Química, da Universidade Federal de  
Sergipe, para a obtenção do título de  
Mestre em Química.

**Orientador: Prof. Dr. Alberto Wisniewski Jr.**

***MIXTURES OF ESTERS PRODUCED FROM ALTERNATIVE***  
***SOURCES OF TRIACYLGLYCEROLS: CONTENT OF ESTERS AND***  
***CONTAMINANTS***

*Master dissertation presented to the*  
*Graduate Programm in Chemistry of*  
*the Federal University of Sergipe to*  
*obtain MSc. in Chemistry.*



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M528m	<p>Melo, Josué Alves</p> <p>Misturas de ésteres produzidos a partir de fontes alternativas de triacilgliceróis : teor de ésteres e contaminantes = Mixtures of esters produced from alternative sources of triacylglycerols : content of esters and contaminants / Josué Alves de Melo ; orientador Alberto Wisniweski Jr. – São Cristóvão, 2017. xxiii, 114 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado em Química)–Universidade Federal de Sergipe, 2017.</p> <p>1. Química. 2. Biodiesel. 3. Poluentes. 4. Cromatografia a líquido. 5. EASI-MS. I. Wisniewski Júnior, Alberto, orient. II. Título</p> <p>CDU: 543.544.122</p>
-------	--



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SERGIPE  
Programa de Pós-graduação em  
Química - PPGQ



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação  
de Mestrado de Josué Alves Melo apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal de Sergipe em 19/12/2016.

Prof. Dr. Alberto Wisniewski Jr  
Departamento de Química - UFS

Prof. Dr. Sandro Navickiene  
Departamento de Química – UFS

Drª. Vanderléa de Souza  
INMETRO/RJ

## RESUMO

Neste trabalho foram identificados os contaminantes presentes em amostras de misturas de ésteres metílicos e etílicos obtidos a partir de fontes alternativas de triacilgliceróis, tais como: óleo residual de fritura (OF), óleo da semente de algodão (OSA), espuma de esgoto (EE), gordura da caixa de gordura (GCG). O teor de ésteres (TE) das amostras foram determinados por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID) conforme a metodologia NBR 15764. As amostras apresentaram TE abaixo de 96,5% (m/m), percentual mínimo estabelecido pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) para se caracterizar as misturas como Biodiesel. A identificação dos ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (FAME ou FAEE) nas misturas foram realizadas por cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas (GC/MS), observando a presença majoritária de ésteres lineares insaturados com dezoito átomos de carbono. Pelo perfil termogravimétrico, foi observado que as amostras OF e OSA apresentaram maior contaminação por compostos de alta massa molecular, aproximadamente 12,00% (m/m), corroborando o TE. Relatos na literatura apontam os processos de degradação oxidativa ou de hidrólise como sendo os responsáveis pela origem de contaminantes nestes tipos de matrizes, reforçados pelos valores de índice de peróxidos obtidos em torno de 196,00 meq kg<sup>-1</sup>. Pela técnica de ionização ambiente por *sonic-spray* (EASI-MS), em modo positivo, foi possível atribuir a presença majoritária de dímeros, confirmados pelos íons de *m/z* 625, 673 e 689, além de diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG). As amostras EE e GCG apresentaram maiores índices de acidez em torno de 28,00 mg KOH g<sup>-1</sup> com maiores contaminações por ácidos graxos livres (FFA). O perfil dos FFA foi determinado por EASI-MS, em modo negativo, e confirmado por derivatização das amostras com N,O-bis(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA) e análise por GC/MS. Os FFA identificados abrangeram uma faixa de seis a dezoito átomos de carbono com a presença majoritária do ácido palmítico, linoleico, oleico e esteárico. Na otimização do método de cromatografia em coluna aberta (CC) para determinação do teor de ésteres e de contaminantes em amostras de misturas de ésteres, o uso da coluna cromatográfica com diâmetro interno de 6 mm, e o uso de hexano:diclorometrano (7:3) para eluição dos ésteres, e o uso de éter

etílico:acetonitrila (8:2) para eluição dos contaminantes foram as condições ideais obtidas na otimização do método de CC. O método otimizado de CC foi aplicado em todas as amostras deste trabalho, e a fração apolar obtida e representativa dos ésteres apresentaram teores de ésteres acima de 96,5% (m/m).

**Palavras-chave:** Teor de ésteres, Biodiesel, Contaminantes, Cromatografia em coluna aberta, EASI-MS.

## **ABSTRACT**

In this study we identified the contaminants present in mixtures of methyl and ethyl esters of samples obtained from alternative sources of triacylglycerols, such as: Frying oil (OF), Cottonseed oil (OSA), Scum sludge (EE), Trap grease (GCG). The esters content (TE) of the samples were determined by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) according to methodology NBR 15764. The samples presented TE below 96.5% (m/m), minimum percentage established by the National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP) to characterize the mixtures as Biodiesel. The identification of fatty acids methyl or ethyl esters (FAME or FAEE) in the mixtures were performed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), observing the presence of linear unsaturated esters with eighteen carbon atoms. By thermogravimetric profile, it was observed that the OF and OSA samples presented higher contamination by compounds of high molecular mass, approximately 12.00% (m/m), corroborating TE results. Reports in the literature indicate the processes of oxidative degradation or hydrolysis as being responsible for the origin of contaminants in these types of matrices, reinforced by the values of peroxide index obtained around 196.00 meq kg<sup>-1</sup>. By the easy ambiente sonic-spray ionization mass spectrometry technique (EASI-MS), in positive mode, it was possible to attribute the presence of dimers, confirmed by *m/z* 625, 673 and 689 ions, in addition to diacylglycerols (DAG) and triacylglycerols (TAG). The EE and GCG samples presented higher acid values around 28.00 mg KOH g<sup>-1</sup> with higher contamination by free fatty acids (FFA). The FFA profile was determined by EASI-MS, in negative mode, and confirmed by derivatization of the samples with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) and posterior GC/MS analysis. The identified FFAs comprised a range of six to eighteen carbon atoms with the majority presence of palmitic, linoleic, oleic and stearic acid. In the optimization of the open column chromatography method (CC) for the gravimetric determination of ester and contaminant content in the esters mixtures, the use of the chromatographic column with a 6 mm internal diameter and the use of hexane:dichloromethane (7:3) to elute the esters, and the use of ethyl ether:acetonitrile (8:2) to elute the contaminants were ideal conditions obtained in the optimization of the CC method. The optimized method of CC

was applied in all the samples of this work, and the apolar fraction obtained and representative of the esters had esters contents above 96.5% (m/m).

**Keywords:** Ester content, Biodiesel, Contaminants, Open column chromatography, EASI-MS.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	– Evolução da oferta interna de energia do Brasil. <b>FONTE:</b> Tolmasquim, 2012 [2].-----	1
<b>Figura 2</b>	– Ranking dos países mais consumidores de biodiesel do mundo entre 2012-2015. <b>FONTE:</b> MME, 2016 [9].-----	3
<b>Figura 3</b>	– Potencial nacional de oferta de biodiesel de diversos insumos, 2008-2017. <b>FONTE:</b> MME, 2009 [10].-----	3
<b>Figura 4</b>	– Posições em vermelho indicam onde se inicia o processo de degradação oxidativa dos ésteres insaturados nas amostras de biodiesel.-----	14
<b>Figura 5</b>	– Esquema reacional para conjugação das duplas ligações do linoleato de metila. <b>FONTE:</b> DANTAS <i>et al.</i> , 2011 [76].--	14
<b>Figura 6</b>	– Esquema do sistema utilizado na análise de biodiesel por EASI-MS. <b>FONTE:</b> ABDELNUR, <i>et al.</i> , 2008 [89].-----	17
<b>Figura 7</b>	– Companhia Estadual de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro-RJ. <b>FONTE:</b> CEDAE, 2016 [105].-----	23
<b>Figura 8</b>	– Separação esquemática dos compostos polares totais por cromatografia em coluna aberta. Adaptado de MÀRQUEZ-RUIZ, 2009 [107].-----	28
<b>Figura 9</b>	– Curvas analíticas do C <sub>18:1</sub> utilizadas para quantificar o teor de ésteres das amostras de misturas de ésteres pela técnica de GC-FID.-----	39
<b>Figura 10</b>	– TICC da solução padrão de FAME da Supelco analisada por GC/MS. Para condições cromatográficas de análise, ver item 3.3.-----	40
<b>Figura 11</b>	– Cromatogramas das correntes totais de íons (TICC) das amostras de misturas de ésteres analisadas por GC/MS.----	43
<b>Figura 12</b>	– Curva termogravimétrica e a sua derivada (DTG) da amostra GCG.-----	50
<b>Figura 13</b>	– Curvas termogravimétricas das amostras de misturas de ésteres sobrepostas.-----	51

<b>Figura 14</b>	– Perfis térmicos <b>a)</b> amostras brutas de misturas de ésteres <b>b)</b> fração apolar obtida pelo processo de cromatografia em coluna aberta.-----	53
<b>Figura 15</b>	– Espectro de massas da amostra OFE obtido por EASI(+)- MS.-----	55
<b>Figura 16</b>	– Espectro de massas da amostra GCG obtido por EASI(+)- MS.-----	56
<b>Figura 17</b>	– Espectro de massas das amostras OFE e GCG obtidos pelo EASI(-)-MS.-----	66
<b>Figura 18</b>	– Estrutura proposta para o íon de $m/z$ 421 identificado pelo EASI(-)-MS.-----	67
<b>Figura 19</b>	– TICC da amostra GCG analisada por GC/MS antes e após a derivatização com BSTFA.-----	71
<b>Figura 20</b>	– TICC de todas as amostras de misturas de ésteres analisadas por GC/MS após a derivatização com BSTFA.---	72
<b>Figura 21</b>	– Área total dos ácidos graxos livres integrados e identificados nas amostras de misturas de ésteres por GC/MS e comparação entre as áreas totais das amostras.--	73
<b>Figura 22</b>	– Cromatogramas das análises por GC-FID da amostra OSA bruta, da fração apolar e da fração dos contaminantes obtida pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta.-----	87
<b>Figura 23</b>	– Cromatogramas das análises por GC-FID das frações dos contaminantes obtidas pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta das amostras de misturas de ésteres.-----	88
<b>Figura 24</b>	– Espectro de massas da amostras OF obtido por EASI(+)- MS.-----	110
<b>Figura 25</b>	– Espectro de massas da amostras EE obtido por EASI(+)- MS.-----	110
<b>Figura 26</b>	– Espectro de massas da amostras OSA obtido por EASI(+)- MS.-----	111

<b>Figura 27</b>	– Espectro de massas da amostras OF obtido por EASI(-)-MS.-----	111
<b>Figura 28</b>	– Espectro de massas da amostras EE obtido por EASI(-)-MS.-----	112
<b>Figura 29</b>	– Espectro de massas da amostras OSA obtido por EASI(-)-MS.-----	112
<b>Figura 30</b>	– Sobreposição dos perfis cromatográficos das amostras de misturas de ésteres brutas, da fração apolar e da fração dos contaminantes obtidas pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta.-----	113

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Percentual das matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil por região em março de 2016. <b>FONTE:</b> ANP, 2016 [8].-----	2
<b>Tabela 2</b>	– Composição de ácidos graxos em óleos vegetais e gorduras animais. <b>FONTE:</b> ISSARIYAKUL & DALAI, 2014; ADEWALE, DUMONT & NGADI, 2015 [26,27].-----	6
<b>Tabela 3</b>	– Classe de compostos formados e classificados, pelo tipo de transformação ou variável responsável pela degradação, em óleos vegetais durante o processo de fritura. <b>FONTE:</b> VIEITEZ <i>et al.</i> , 2014 [44].-----	9
<b>Tabela 4</b>	– Perda de massas em função da temperatura dos compostos comuns encontrados no biodiesel por análise termogravimétrica. <b>FONTE:</b> ÇAYLI & KÜSEFOĞLU, 2008 [98].-----	19
<b>Tabela 5</b>	– Matérias-primas utilizadas na produção das amostras de misturas de ésteres.-----	22
<b>Tabela 6</b>	– Parâmetros cromatográficos aplicados nas análises das amostras de misturas de ésteres por GC/MS.-----	25
<b>Tabela 7</b>	– Ensaio realizado na otimização do método 2-507 [106] para determinação de contaminantes em amostras de misturas de ésteres.-----	34
<b>Tabela 8</b>	– Condições cromatográficas aplicadas na determinação do teor de ésteres por GC-FID das amostras de misturas de ésteres e da fração apolar obtida pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta.-----	36
<b>Tabela 9</b>	– Teores de ésteres das amostras de misturas de ésteres quantificadas por padronização externa utilizando GC-FID.-	39
<b>Tabela 10</b>	– Dados cromatográficos da análise da solução padrão de FAME da marca Supelco analisados por GC/MS.-----	41
<b>Tabela 11</b>	– Área relativa dos ésteres presentes nas amostras de misturas de ésteres identificados por GC/MS.-----	44

<b>Tabela 12</b>	– Tratamento das amostras de misturas de ésteres por cromatografia em coluna aberta com sílica desativada a 5% de água (m/m) pelo método publicado da IUPAC 2-507 [106].-----	47
<b>Tabela 13</b>	– Comparação do teor de ésteres das amostras de misturas de ésteres obtidos pelo método de GC-FID e pelo método de cromatografia em coluna aberta.-----	48
<b>Tabela 14</b>	– Identificação dos ésteres presentes nas amostras de misturas de ésteres por EASI(+)-MS.-----	57
<b>Tabela 15</b>	– Contaminantes oriundos da oxidação das AME detectados no EASI(+)-MS.-----	59
<b>Tabela 16</b>	– Dímeros e dímeros na forma de hidroperóxidos identificados nas amostras de misturas por EASI(+)-MS.----	62
<b>Tabela 17</b>	– Íons de $m/z$ entre 800-1000 identificados nas amostras de misturas de ésteres por EASI(+)-MS.-----	65
<b>Tabela 18</b>	– Ácidos graxos livres identificados nas amostras de misturas de ésteres pelo EASI(-)MS.-----	68
<b>Tabela 19</b>	– Índices de acidez determinados nas amostras de misturas de ésteres.-----	69
<b>Tabela 20</b>	– Compostos identificados por GC/MS após a derivatização das amostras de misturas de ésteres com BSTFA.-----	74
<b>Tabela 21</b>	– Índices de peróxidos determinados nas amostras de misturas de ésteres pelo Método Cd 8-53.-----	79
<b>Tabela 22</b>	– Tipo de contaminação presente nas amostras de misturas de ésteres estudadas neste trabalho.-----	80
<b>Tabela 23</b>	– Resultados dos ensaios obtidos na otimização do método de cromatografia em coluna aberta para determinação do teor de contaminantes em amostras de misturas de ésteres utilizando 200 mg da amostra GCG.-----	82
<b>Tabela 24</b>	– Tratamento das amostras de misturas de ésteres pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta com sílica desativada a 5% de água (m/m).-----	85
<b>Tabela 25</b>	– Comparação do teor de ésteres das amostras de misturas	

	de ésteres obtido pelo método de GC-FID e pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta.-----	86
<b>Tabela 26</b>	– Teor de ésteres determinados por GC-FID das amostras de misturas de ésteres e das frações apolares (ésteres) obtidas pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta.-----	89
<b>Tabela 27</b>	– Especificação do Biodiesel.-----	107

**LISTA DE EQUAÇÕES**

<b>Equação 1</b>	– Equação utilizada para calcular o percentual teórico de compostos polares totais.-----	27
<b>Equação 2</b>	– Equação utilizada para o cálculo do índice de acidez nas amostras de misturas de ésteres.-----	30
<b>Equação 3</b>	– Equação utilizada para o cálculo do índice de peróxido nas amostras de misturas de ésteres.-----	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	– Associação Brasileira de Normas Técnicas
AME	– Amostras de misturas de ésteres
ANP	– Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOCS	– <i>American Oil Chemistry Society</i>
ASTM	– <i>American Society for Testing and Materials</i>
BSTFA	– N,O-bis(trimetilsilil)trifluoracetamida
CEN	– Comitê Europeu de Normalização ( do inglês, <i>European Commitee Standardization</i> )
CC	– Cromatografia em coluna aberta
CPT	– Compostos Polares Totais
DAG	– Diacilgliceróis
EASI	– Ionização Ambiente por <i>sonic-spray</i> (do inglês, <i>Easy Ambient Sonic-Spray Ionization</i> )
EE	– Escuma de esgoto
EN	– Norma Europeia (do inglês, <i>European Standard</i> )
EPE	– Empresa de Pesquisas Energéticas
ESI	– Ionização por <i>electrospray</i> (do inglês, <i>Electrospray Ionization</i> )
ESI-FT-ICR MS	– Ionização por <i>electrospray</i> e espectrometria de massas de ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (do inglês, <i>Electrospray Ionization and Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i> )
ETE	– Estação de tratamento de águas e esgoto
FAEE	– Ésteres etílicos de ácidos graxos (do inglês, <i>Fatty Acid Ethyl Esters</i> )
FAME	– Ésteres metílicos de ácidos graxos (do inglês, <i>Fatty Acid Methyl Esters</i> )
FFA	– Ácido graxo livre (do inglês, <i>Free Fatty Acid</i> )
GC	– Cromatografia Gasosa (do inglês, <i>Gas Chromatography</i> )
GC/FID	– Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização por



	Chama (do inglês, <i>Gas Chromatography/Flame Ionization Detection</i> )
GC/MS	– Cromatografia em Fase Gasosa/Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> )
GCG	– Gordura da caixa de gordura
GCxGC-FID	– Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente com Detector de Ionização por Chama (do inglês, <i>Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography / Flame Ionization Detection</i> )
GR's	– Gorduras residuais
IA	– Índice de acidez
ISO	– <i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	– União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure And Applied Chemistry</i> )
MME	– Ministério de Minas e Energia
MAPA	– Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OF	– Óleo residual de fritura metílico
OFE	– Óleo residual de fritura etílico
OFR's	– Óleo de fritura residuais
OGR's	– Óleo e gorduras residuais
OSA	– Óleo da semente de algodão
PTV	– Injetor com temperatura programada de vaporização (do inglês, <i>Programmed Temperature Vaporizing</i> )
T <sub>R</sub>	– Tempo de retenção (do inglês, <i>Retention Time</i> )
SCAN	– Modo de varredura linear
SFA	– Ácidos graxos saturados (do inglês, <i>Saturated Fatty Acids</i> )
TAG	– Triacilgliceróis
TE	– Teor de ésteres
tep	– Tonelada equivalente de petróleo
TICC	– Cromatograma da corrente total de íons (do inglês, <i>Total</i>

*Ion Current Chromatogram)*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Biodiesel.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Óleos e gorduras residuais como fontes alternativas de triacilglicereóis que podem ser utilizados para produção de biodiesel .....</b>	<b>7</b>
1.2.1	<i>Gordura bovina .....</i>	7
1.2.2	<i>Óleo residual de fritura.....</i>	8
1.2.3	<i>Gordura da caixa de gordura .....</i>	9
1.2.4	<i>Escuma de esgoto .....</i>	10
1.2.5	<i>Óleo da semente de algodão .....</i>	11
<b>1.3</b>	<b>Parâmetros de qualidade do biodiesel estabelecido pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.....</b>	<b>12</b>
1.3.1	<i>Teor de ésteres em biodiesel .....</i>	13
<b>1.4</b>	<b>Contaminantes oriundos da degradação do biodiesel.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5</b>	<b>Técnicas instrumentais em análises de biodiesel .....</b>	<b>16</b>
1.5.1	<i>Cromatografia gasosa (GC) .....</i>	16
1.5.2	<i>Espectrometria de Massas.....</i>	16
1.5.2.1	<i>Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS).....</i>	16
1.5.2.2	<i>Ionização por <i>electrospray</i>/espectrometria de massas (ESI-MS) .....</i>	16
1.5.2.3	<i>Ionização ambiente por <i>sonic-spray</i>/espectrometria de massas (EASI-MS) ....</i>	17
1.5.3	<i>Análise Termogravimétrica (TG) .....</i>	18
<b>1.6</b>	<b>Determinação de compostos polares totais em amostra de óleo residual utilizando cromatografia em coluna aberta de sílica .....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção das amostras de mistura de ésteres .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Determinação do teor de ésteres por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID) .....</b>	<b>23</b>
3.2.1	<i>Preparo das soluções das misturas de ésteres e da curva analítica ....</i>	23

3.2.2	<i>Condições cromatográficas utilizadas na determinação do teor de ésteres das amostras de misturas de ésteres por GC-FID</i> .....	24
3.3	<b>Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS) utilizada na identificação dos ésteres das amostras de misturas de ésteres (AME)</b> .....	25
3.4	<b>Determinação dos compostos polares totais (CPT) presentes nas amostras de misturas de ésteres por cromatografia em coluna aberta de sílica (CC)</b> .....	26
3.4.1	<i>Empacotamento da coluna aberta de sílica aplicada na determinação dos CPT presentes nas AME</i> .....	26
3.4.2	<i>Eluição dos compostos polares totais presentes nas amostras de misturas de ésteres</i> .....	27
3.5	<b>Análise termogravimétrica (TG) das amostras de misturas de ésteres</b> .....	28
3.6	<b>Caracterização das amostras de misturas de ésteres por ionização ambiente por <i>sonic-spray</i>/espectrometria de massas (EASI-MS)</b> .....	28
3.7	<b>Determinação do índice de acidez das amostras de misturas de ésteres</b> .....	29
3.7.1	<i>Padronização da solução alcoólica de KOH</i> .....	29
3.7.2	<i>Índice de acidez</i> .....	29
3.8	<b>Caracterização dos ácidos graxos livres presentes nas amostras de misturas de ésteres (AME) por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS)</b> .....	30
3.9	<b>Determinação do índice de peróxido das amostras de misturas de ésteres</b> .....	31
3.9.1	<i>Padronização da solução de tiosulfato de sódio (<math>\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3</math>)</i> .....	31
3.9.2	<i>Índice de peróxido</i> .....	31
3.10	<b>Otimização do processo de cromatografia em coluna aberta 2-507 para determinação do teor de contaminantes em amostras de misturas de ésteres</b> .....	32
3.11	<b>Determinação do teor de ésteres por GC-FID em amostras de misturas de ésteres e da fração apolar obtida pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta</b> .....	35

3.12	Limpeza de vidrarias e armazenamento de resíduos orgânicos ....	37
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
4.1	Teor de ésteres determinado em amostras de misturas de ésteres por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID).....	38
4.2	Caracterização dos ésteres nas amostras de misturas de ésteres por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS) .....	40
4.3	Teor de compostos polares totais (CPT) determinados em amostras de misturas de ésteres pelo método cromatografia em coluna aberta (CC) .....	46
4.4	Análise termogravimétrica utilizada na determinação do percentual (m/m) de ésteres e no percentual (m/m) de contaminantes em amostras de misturas de ésteres.....	49
4.5	Aplicação da ionização ambiente por <i>sonic-spray</i> (EASI-MS) na caracterização das amostras de misturas de ésteres .....	54
4.5.1	<i>Caracterização da composição química das amostras de misturas de ésteres por EASI(+)-MS.....</i>	<i>54</i>
4.5.1.1	Caracterização dos ésteres presentes nas amostras de misturas de ésteres..	54
4.5.1.2	Caracterização dos produtos de oxidação primário gerados nas amostras de misturas de ésteres .....	58
4.5.1.3	Caracterização dos produtos de oxidação secundários gerados nas amostras de misturas de ésteres .....	60
4.5.2	<i>Caracterização da composição química das amostras de misturas de ésteres por EASI(-)-MS.....</i>	<i>66</i>
4.6	Determinação do índice de acidez nas amostras de misturas de ésteres .....	69
4.7	Caracterização dos ácidos graxos livres por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS) .....	70
4.8	Índice de peróxidos determinados nas amostras de misturas de ésteres pelo método Cd 8-53.....	79
4.9	Otimização do método de cromatografia em coluna aberta (IUPAC, 2-507) aplicado na determinação do teor de ésteres e de contaminantes em amostras de misturas de ésteres.....	81

4.10	Teor de ésteres determinado por GC-FID em amostras de misturas de ésteres e da fração apolar obtida pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta.....	89
5	CONCLUSÕES.....	91
6	PERSPECTIVAS DO TRABALHO .....	93
7	REFERÊNCIAS .....	94
8	ANEXOS.....	107
9	APÊNDICES .....	110

*Dedico este trabalho a Deus, a minha esposa, Queila Martes Melo, aos meu pais, Maria Francisca Alves Rocha Melo e Ronaldo Alves Melo e aos meus irmãos, por todo apoio incondicional e carinho durante o mestrado.*

*“Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina, pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas”.*

(Augusto Cury)



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me dado forças para chegar até aqui. Sei que sem o apoio Dele nada disso teria acontecido, pois segundo declara a sua palavra, sem Ele nada podemos fazer.

Aos meus pais Maria Francisca Alves Rocha Melo e Ronaldo Alves Melo pelo apoio incondicional durante todo o tempo de estudo e carinho para comigo. Sei que muitas vezes deixaram de sonhar os próprios sonhos para sonharem juntamente comigo os meus sonhos e objetivos. Vocês são meu exemplo de vida. Não podendo esquecer dos meus irmãos Loami, Greyce e Marcela pelo carinho, amor e cumplicidade.

A minha esposa Queila Martes Melo pela compreensão das horas dedicadas aos estudos e pelo apoio a seguir carreira acadêmica. O seu cuidado diário para comigo é o alicerce que sustenta toda a casa para que em dias de vendavais ela resista aos intempéries da vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alberto Wisniewski Jr., pelo conhecimento sem reserva compartilhado durante toda Iniciação Científica e Mestrado. Todas as discussões e orientações do trabalho contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Ao Grupo de Pesquisa em Petróleo e Energia da Biomassa (PEB) e ao Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP).

Ao Doutorando Jandyson Machado Santos e a Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, em especial ao laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas pelas análises de EASI-MS.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido ao projeto através do processo do edital 558724/2010-8, pela bolsa de Mestrado concedida e ao processo do EDITAL FAPITEC/SE /FUNTEC/CNPq Nº 04/2011.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Regina de Souza Moraes pela disposição e esclarecimentos de dúvidas sobre o trabalho desenvolvido no mestrado.

Aos professores da banca de defesa da Dissertação, Prof. Dr. Sandro Navickiene e a Dr<sup>a</sup>. Vanderléa de Souza.

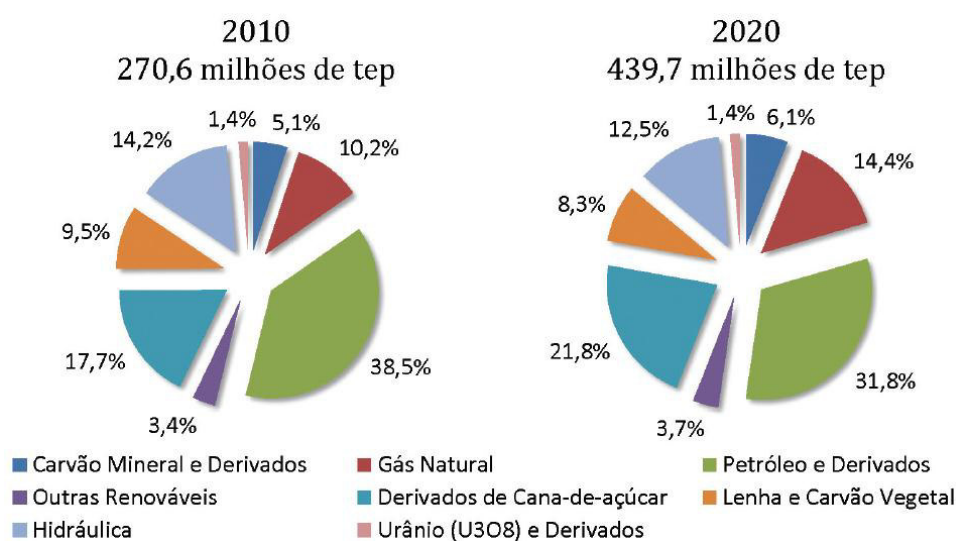
Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente para realização deste trabalho.

## 1 INTRODUÇÃO

A procura de formas e de fontes alternativas de energia é crescente, e possui um papel importante no mundo moderno. Atualmente, a maior parte da energia é obtida a partir de combustíveis fósseis [1].

No Brasil, até 2020, a demanda total de energia do país deverá crescer 5,3% ao ano, chegando a 372 milhões de toneladas equivalente de petróleo (tep). A indústria e o setor de transportes continuarão a ser os principais responsáveis por esse consumo com cerca de 67% do total [2]. A Figura 1 mostra a tendência de consumo de energia baseado em diferentes fontes.

**Figura 1** – Evolução da oferta interna de energia do Brasil. **FONTE:** Tolmasquim, 2012 [2].



Embora as preocupações ambientais tenham aumentado a respeito da poluição veicular decorrente da queima de combustíveis fósseis, muitos governos têm negligenciado este problema que contribui significativamente para as alterações climáticas [3].

Portanto, como consequência das preocupações ambientais e os custos crescentes de combustíveis fósseis, a necessidade de encontrar alternativas a eles é um importante passo neste sentido [4,5].

## 1.1 Biodiesel

O biodiesel é uma fonte de combustível e energia constituída de monoalquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, que pode ser produzido a partir de fontes biológicas renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais [6].

As matérias-primas para produção de biodiesel variam de país para país, da localidade e da região de produção. Neste contexto, pesquisadores estão tentando encontrar várias maneiras de produzir biodiesel a partir de matérias-primas disponíveis localmente, tais como: óleo vegetal (comestível e não comestível), sebo animal, óleo de cozinha usado e algas [7]. Os dados da Tabela 1 foram extraídos do boletim mensal (abril/2016) da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) e apresenta a regionalidade das fontes de matérias-primas para a produção de biodiesel.

**Tabela 1** – Percentual das matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel no Brasil por região em março de 2016. **FONTE:** ANP, 2016 [8].

Matéria-Prima	% das matérias-primas para produção de biodiesel				
	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul
Óleo de Soja	92,12	71,72	88,04	31,29	74,78
Gordura Bovina	-	19,12	7,12	58,46	20,48
Óleo de Algodão	-	1,42	1,62	0,59	-
Outros Materiais Graxos	7,87	-	1,76	1,19	2,02
Óleo de Fritura usado	0,01	0,16	0,03	8,22	0,12
Gordura de Porco	-	-	0,08	-	2,59
Óleo de Palma / Dendê	-	7,58	1,34	0,26	-

Segundo o boletim mensal (abril/2016) do Ministério de Minas e Energia (MME), apresentado na Figura 2, o Brasil está entre os maiores consumidores de biodiesel do mundo.



O biodiesel é um substituto viável para o combustível diesel derivado do petróleo, pois, além de ser biodegradável e renovável, apresenta propriedades semelhantes a ele, assim não há necessidade de modificações no motor de ignição por compressão que opera com diesel [11,12]. Logo, existem grandes oportunidades do biodiesel ser utilizado para fins de transporte (rodoviário, ferroviário e fluvial) de passageiros, mercadorias, e em motores estacionários para geração de energia [13].

Algumas das vantagens do biodiesel frente ao diesel fóssil que podem ser destacadas são: é um combustível com menor emissão de gases do efeito estufa, é renovável, biodegradável, essencialmente livre de enxofre e de aromáticos e não tóxico. Isso reduz significativamente as emissões tóxicas quando queimado como combustível [14,15].

No entanto, mesmo que o biodiesel tenha mais vantagens do que desvantagens, vários obstáculos permanecem. Os desafios incluem problemas enfrentados durante os pré-processos, como pouco interesse do produtor, e isto acontece quando a matéria-prima é muito cara em comparação com o custo de processamento em si, e a concorrência entre produzir biocombustível frente a cadeia alimentícia; durante os processos (problema dos resíduos) e pós-processos, relacionados à qualidade e à sustentabilidade [16].

Vários fatores contribuem para o custo da produção de biodiesel, como o tipo da matéria-prima (óleos comestíveis e não comestíveis), reagentes, natureza da purificação dos óleos e armazenamento, entre outros. O principal fator econômico a ser considerado é a matéria-prima, que representa cerca de 70-80% do custo total da produção [17–19].

Neste contexto, com intuito de baixar o custo da produção de biodiesel surgem as biomassas de óleos e gorduras residuais (OGR's) como fontes alternativas, tais como: a biomassa de microalgas, óleo de cozinha usado, gordura de frango, algas *Spirulina platensis*, e gordura de porco [20].

A produção de biodiesel normalmente é realizada pela transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais via catálise básica na presença de álcoois de cadeia curta, como metanol e etanol, para formar os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) ou ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE), respectivamente. Este método normalmente precisa de matérias-primas refinadas com baixos teores de ácidos graxos livre (FFA), caso

contrário, o processo de produção final resultará em alta formação de sabões, por conseguinte, ocorrerá um decréscimo no rendimento da reação. Portanto, é necessário o estudo da composição química das matérias-primas alternativas que viabilizem a produção de biodiesel [21–25]. Na Tabela 2 são apresentadas a composição de ácidos graxos em óleos vegetais e gorduras animais.

**Tabela 2** – Composição de ácidos graxos em óleos vegetais e gorduras animais. **FONTE:** ISSARIYAKUL & DALAI, 2014; ADEWALE, DUMONT & NGADI, 2015 [26,27] .

Óleos vegetais e gorduras animais		Composição de ácidos graxos (massa, %)											
Nome comum	Espécie	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1
Canola	<i>Brassica campestris</i>	-	-	3,1	0,2	1,3	56,6	22,4	14,0	0,4	-	0,2	0,1
Canola	<i>Brassica napus</i>	-	-	4,3	0,3	1,7	61,0	20,8	9,3	0,6	-	0,3	-
Soja	<i>Glycine max</i>	-	-	10,1	-	4,3	22,3	53,7	8,1	-	-	-	-
Palma	<i>Elaeis guineensis</i>	0,3	1,2	44,3	-	4,3	39,3	10,0	-	-	-	-	-
Girassol	<i>Helianthus annuus</i>	-	-	5,2	0,1	3,7	33,7	56,5	-	-	-	-	-
Milho	<i>Zea mays</i>	-	-	11,6	-	2,5	38,7	44,7	1,4	-	-	-	-
Oliva	<i>Olea europea</i>	-	-	13,8	1,4	2,8	71,6	9,0	1,0	-	-	-	-
Semente de algodão	<i>Gossypium hirsutum</i>	-	-	23,0	-	2,3	15,6	55,6	0,3	-	-	-	-
Côco	<i>Cocos nucifera</i>	50,9	21,1	9,5	-	4,9	8,4	0,6	-	-	-	-	-
Karanja	<i>Pongamia Pinnata</i>	-	-	11,7	-	7,5	51,6	16,5	2,7	-	-	-	-
Pinhão manso	<i>Jatropha curcas</i>	-	-	18,5	-	2,3	49,0	29,7	-	-	-	-	-
Sebo	-	-	2,8	26,0	2,8	17,5	41,7	6,9	-	0,4	1,9	-	-
Banha de porco	-	-	1,4	25,7	2,8	14,5	40,9	12,9	-	0,5	1,3	-	-
Gordura de frango	-	-	-	22,2	8,4	5,1	42,5	19,3	1,0	-	-	-	-



## **1.2 Óleos e gorduras residuais como fontes alternativas de triacilglicereóis que podem ser utilizados para produção de biodiesel**

Os óleos e gorduras residuais (OGR's) são altamente poluentes. Esses resíduos são uma alternativa atraente para produção de biodiesel, uma vez que minimizam o impacto ambiental, geram energia renovável, geram novos empregos e contribuem para um desenvolvimento sustentável [28].

A indústria de sabão é o principal destino das gorduras residuais (GR's), mas quando esse mercado está sobrecarregado, as gorduras são geralmente incineradas ou destinadas a um aterro sanitário. Em ambos os casos, há um impacto ambiental [29].

Algumas dessas matérias-primas incluem o sebo (bovino e de carneiro), gordura de frango, resíduos sólidos e indústria de couro, entre outros. Por se tratar de um resíduo, as gorduras residuais resultam em matéria-prima de baixo custo para produção de biodiesel [27].

Os diferentes tipos de gorduras residuais tem em sua composição diferentes teores de ácidos graxos saturados (SFA), geralmente mirístico, palmítico e esteárico [30]. O teor de SFA no sebo bovino é de 45,6%, no sebo de carneiro 61,1%, e, de 32,0% na gordura de frango [31].

Um dos fatores limitadores na utilização de óleos vegetais e gorduras de origem animal como combustível em motores a diesel é a sua tendência para solidificar em regiões de clima frio. Além disso, óleos vegetais puros e gorduras animais são demasiadamente viscosos para serem utilizados diretamente em motores a diesel [32]. A pirólise e a transesterificação são estratégias utilizadas para solucionar os problemas operacionais causados pelo uso direto de óleos vegetais e gorduras animais, pois esses processos diminuem a viscosidade e o ponto de fusão deles [33,34].

### *1.2.1 Gordura bovina*

A elevada produção de sebo bovino das instalações de abate/processamento e preços historicamente baixos dessa matéria-prima pode ter vantagens energéticas, ambientais e econômicas que podem ser

exploradas [35]. Além disso, preocupações com a doença da vaca louca (encefalopatia espongiforme) bovina levaram a restrições no comércio e no embarque de sebo, reduzindo a demanda para usos tradicionais [36].

### *1.2.2 Óleo residual de fritura*

Resíduos de óleo de cozinha são acumulados em grandes quantidades todo ano em todos os países; e, liberar este volume de óleo no ambiente pode causar problemas ambientais e obstruções nos tubos de drenagem. Portanto, a utilização de óleos residuais é uma fonte promissora para a produção de biodiesel [37].

A produção crescente de óleos de fritura residuais (OFR's) a partir de fontes residenciais e industriais é um problema crescente em todo o mundo. O descarte de óleo no sistema de esgoto gera problemas para a estação de tratamento de águas residuais (ETE) e uma perda de energia, pois no percurso da tubulação residencial até a ETE o óleo residual pode ser degradado e não aproveitado para produção de biodiesel [38]. Estima-se que um litro de óleo de fritura usado pode contaminar um milhão de litros de água [39].

As preocupações recentes com a sustentabilidade, meio ambiente e custos das matérias-primas fizeram a utilização de OFR's atraentes para a indústria, especialmente para a produção de biodiesel [40].

Assim, os OFR's como matéria-prima para a produção de biodiesel podem reduzir significativamente o custo da produção total de biodiesel. Portanto, a produção de biodiesel a partir de OFR's e de outros resíduos gordurosos tem a vantagem da reciclagem dos resíduos sem competir com o mercado de alimentos [41].

No entanto, o reuso excessivo de óleos vegetais pode provocar várias mudanças físicas e químicas em sua composição. Das alterações físicas, podem ser destacadas: aumento da viscosidade, aumento do calor específico, e mudança na cor, por exemplo. No processo de fritura os óleos são submetidos a quatro tipos de reações: termolítica, oxidativa, hidrolítica e polimerização [42].

Os OFR's usados podem conter mais de 400 produtos diferentes induzidos pelo calor de reação. Dentre eles, os compostos polares totais (CPT) estão inclusos, que podem ser ácidos graxos livre, hidroperóxidos, aldeídos, álcoois, cetonas, epóxidos, entre outros. Esses compostos são uma medida global de toda a oxidação e hidrólise que ocorreu no óleo [43]. A Tabela 3 resume as variáveis que influenciam na degradação do óleo.

**Tabela 3** – Classe de compostos formados e classificados, pelo tipo de transformação ou variável responsável pela degradação, em óleos vegetais durante o processo de fritura. **FONTE:** VIEITEZ *et al.*, 2014 [44].

Alteração	Parâmetro	Compostos formados
Oxidação	Ar	Monômeros oxidados, dímeros e polímeros, compostos voláteis.
Térmica	Temperatura	Dímeros e polímeros, monômeros cíclicos, compostos oxidados.
Hidrólise	Umidade	Ácidos graxos livres.

### 1.2.3 Gordura da caixa de gordura

Restaurantes e serviços de fornecimento de comida rápida geram fluxos de águas residuais que contêm quantidades consideráveis de sólidos suspensos totais, bem como óleos e gorduras [45]. Óleos e gorduras liberados para o sistema de esgoto podem obstruir ou corroer tubulações de esgoto, levando a danos na infraestrutura, causando impactos ambientais graves como o lançamento de águas residuais no solo e superfície de corpos d'água [46].

Esses depósitos de gordura levam a uma redução da capacidade de transporte, que ao obstruírem a rede de esgoto, custam aos municípios milhões de dólares por ano para executar serviços de limpeza, reparo e em taxas de manutenção [47].

A gordura da caixa de gordura tem um alto teor de ácidos graxos livres e maior proporção de mono, di e triacilgliceróis. A gordura extraída pode ser classificada de duas formas, se o teor de FFA for menor do que 15% (m/m), a

gordura é classificada como amarela; se for maior do que 15% (m/m) é classificada como marrom [48].

Embora o processo de transesterificação convencional apresente altos rendimentos para óleos vegetais, ele não pode ser utilizado quando a matéria-prima possuir um teor de ácidos graxos livre (FFA) maior que 5% (m/m), pois simultaneamente a formação dos ésteres provenientes dos triacilgliceróis (TAG), ocorrerá a formação de sabão, como consequência, o rendimento da reação decresce, além de gerar problemas na etapa de lavagem devido as emulsões formadas [49].

Para resolver este problema, deve-se primeiro realizar um pré-tratamento através da reação de esterificação dos FFA catalisada por ácido, seguido por transesterificação catalisada por base. A esterificação ácida é comumente realizada utilizando ácido sulfúrico e metanol, entretanto, existem problemas neste processo, tais como, corrosão e problema ambiental [50].

#### *1.2.4 Escuma de esgoto*

Escuma de esgoto é um material flutuante formado na superfície de tanques de decantação primários e secundários nas estações de tratamento de águas e esgoto (ETE), especialmente no tanque primário na superfície da câmara de areia. Aproximadamente 60% dos óleos vegetais usados são descartados diretamente no sistema de esgoto e acabam nas ETE. Assim, a composição química da escuma de esgoto é rica em óleos e gorduras residuais (OGR's) [51].

Como os OGR's apresentam densidade inferior à da água, eles ficam na superfície aglomerado com outros resíduos de modo a formar uma camada de escuma rica em OGR's, o que a torna uma rica fonte de energia. O teor de OGR's na escuma de esgoto pode ser tão elevada quanto 60% [22].

Deste modo, a possibilidade de obtenção de FAME a partir da escuma de esgoto representa um objetivo importante em dois campos diferentes, por um lado, é um meio alternativo de eliminação de resíduos, e, por outro, uma fonte de matéria-prima de baixo custo para a produção de biodiesel [52]. Assim, a escuma de esgoto pode ser uma fonte de baixo custo, não-

comestível, e facilmente disponível em abundância, o que pode tornar a produção de biodiesel rentável [53]. Neste contexto, a espuma de esgoto representa uma fonte inovadora, que respeita plenamente os critérios de sustentabilidade [54].

O tratamento da espuma de esgoto gerada nas ETE pode ser feito através da combustão e da digestão anaeróbica, porém, em termos de lucratividade a produção de biodiesel é 29,0% e 104,0% maior do que a combustão e digestão anaeróbica, respectivamente [55,56].

#### *1.2.5 Óleo da semente de algodão*

A estimativa do plantio de algodão em pluma no Brasil é crescente. As projeções do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) indicam produção do algodão em pluma de 1,5 milhão de toneladas em 2015/2016 e de 2,2 milhões de toneladas em 2024/2025. Essa expansão corresponde a uma taxa de crescimento de 3,6% ao ano [57].

A planta de algodão, além de produzir fibras, possui um valor econômico agregado em virtude do teor de óleo presente em suas sementes. Mundialmente, o óleo da semente de algodão é o sexto mais produzido, e no Brasil, é considerado o segundo óleo mais produzido no país [58].

A planta de algodão é uma matéria-prima que pode ser utilizada para produção de biodiesel, uma vez que, em suas sementes o percentual de óleo pode variar entre 14 a 25% [59,60], e em virtude das propriedades físico-químicas do óleo da semente de algodão, a produção de biodiesel se torna favorável [61].

Para o óleo de algodão ser comercializado para fins alimentícios e como matéria-prima para produção de biodiesel, é necessário que ele passe por um processo de refino que elimine o gossipol presente nas sementes de algodão. O gossipol é um terpenóide biologicamente ativo presente nas sementes de algodão, considerado como uma toxina nociva para saúde humana e que provoca a deterioração do óleo [62].

### **1.3 Parâmetros de qualidade do biodiesel estabelecido pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**

A Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) é o órgão responsável pela fiscalização dos parâmetros de qualidade do biodiesel. Através da Resolução de Nº 45, de 13 de agosto de 2014, em anexo na página 107, a ANP regulamenta as características de um biodiesel [63].

Idealmente o biodiesel deve ser constituído por 100% de FAME, porém, a baixa conversão de mono, di e triacilgliceróis e a competição de reações secundárias na obtenção do biodiesel ocasionam dificuldade de separação dos ésteres e das impurezas após a reação de transesterificação, por conseguinte ocorre uma mistura de ambos ao término da produção de biodiesel. Portanto, há necessidade da caracterização do biodiesel e da matéria-prima utilizada para sua produção [64].

Os parâmetros de qualidade servem especificadamente para determinar se um produto pode ser disponibilizado ao comércio, sem que haja prejuízo em seu uso pela população e ao meio ambiente. Assim, nos pontos de revenda o consumidor obterá um produto aprovado pelo órgão que o rege [65].

Na Tabela 27, no Anexo da página 107, estão apresentados os parâmetros e as obrigações quanto ao controle de qualidade do biodiesel exigido pela ANP. No entanto, para cumprir esse padrão de qualidade, é necessário a otimização do processo de produção e o aperfeiçoamento, se necessário, de alguma metodologia utilizada para um determinado parâmetro de qualidade exigido no biodiesel [16]. Os parâmetros de qualidade do biodiesel devem ser realizados conforme os critérios da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), da *International Organization for Standardization* (ISO) e do *Comité Européen de Normalisation* (CEN), os quais são regulamentados pela ANP em 2014 [63].

### 1.3.1 *Teor de ésteres em biodiesel*

Entre os parâmetros de qualidade do biodiesel está o teor de ésteres. Em março de 2008, a ANP publicou a Resolução nº 7 que estabelece um teor de 96,5% (m/m) como pureza mínima do biodiesel, esse percentual permanece inalterado até a resolução contemporânea de Nº 45 de agosto de 2014 [66]. O teor de ésteres pode ser determinado pelas metodologias NBR 15764:2009 [67] e da EN14103:2011 [68].

O baixo teor de ésteres influencia diretamente nas propriedades químicas e físicas do biodiesel. Portanto, para se obter um biocombustível de alta qualidade, a reação de transesterificação deve ser completa e o processo de purificação após a reação deve ser eficaz. Assim, o teor de contaminantes remanescentes (FFA, traços de metanol, água etc.) deverá ser baixo, para que o teor de ésteres seja alto [69].

## 1.4 **Contaminantes oriundos da degradação do biodiesel**

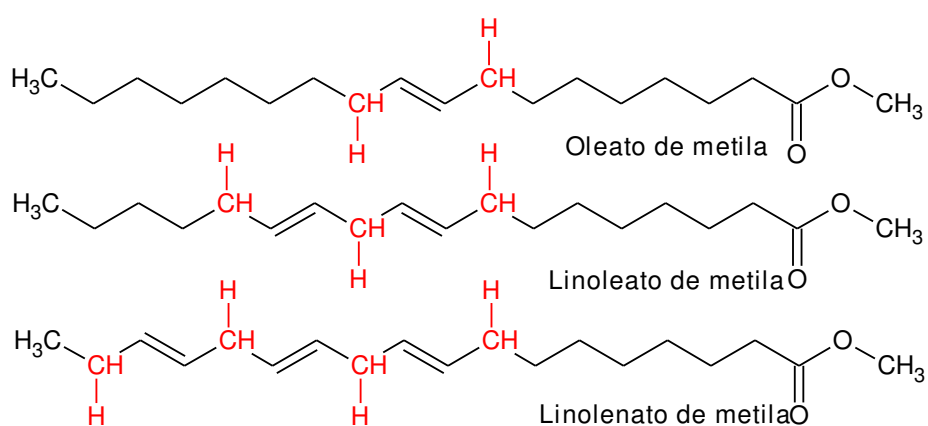
A composição química do biodiesel depende da matéria-prima utilizada para sua produção, e quando comparado com o diesel, as insaturações presentes nas moléculas dos ésteres conferem ao biodiesel uma menor estabilidade oxidativa [70]. Vários fatores podem influenciar na estabilidade oxidativa e na qualidade do biodiesel, tais como: calor, ar, luz, água e tempo de armazenamento [71,72].

Durante o período de estocagem, o biodiesel pode sofrer degradação pelo processo de hidrólise e de oxidação, que são influenciados pela temperatura. Ambos os processos podem contribuir para o aumento de ácidos graxos livre (FFA) [73]. A absorção de humidade atmosférica nas amostras de biodiesel, além de promover a hidrólise dos ésteres resultando em FFA, que promove a corrosão dos tanques de estocagem com deposição de sedimentos, também está associada à proliferação de micro-organismos [69].

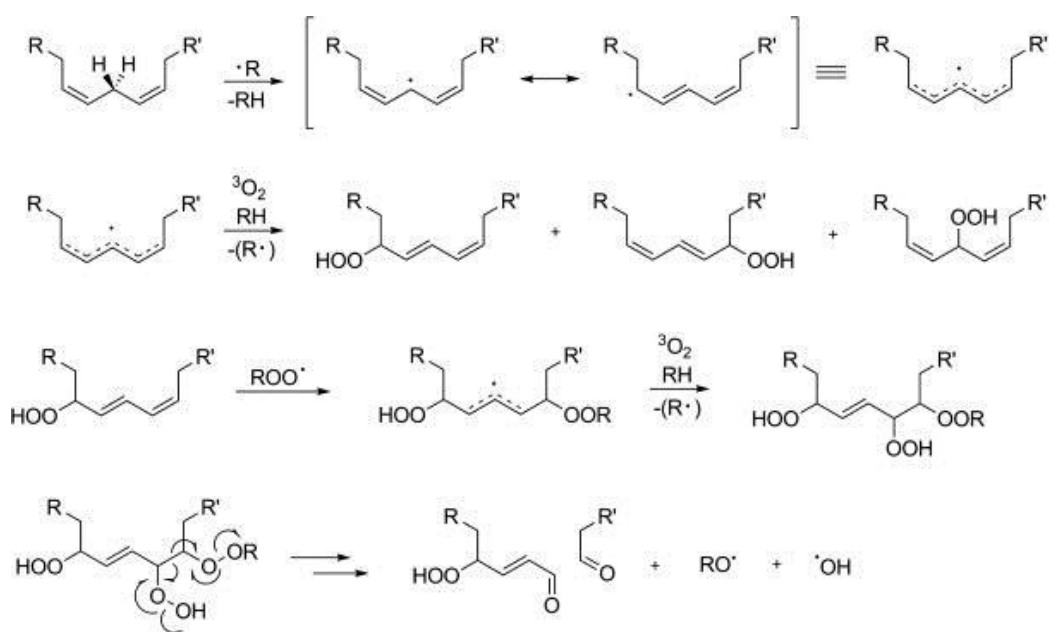
O primeiro passo da oxidação do biodiesel é a quebra homolítica da ligação entre o hidrogênio e o carbono adjacente às insaturações contidas nos ésteres, gerando radicais livres. Este processo de reações em cadeia de

radicais livres prossegue através de passos de iniciação, propagação e terminação. Logo, o aumento do número de ligações duplas conjugadas, aumenta a sensibilidade à oxidação do biodiesel [74,75]. A Figura 4, mostra as posições das ligações destacadas em vermelho que dão início ao processo de degradação por oxidação; a Figura 5 é um exemplo do processo de degradação oxidativa.

**Figura 4** – Posições em vermelho indicam onde se inicia o processo de degradação oxidativa dos ésteres insaturados nas amostras de biodiesel.



**Figura 5** – Esquema reacional para conjugação das duplas ligações do linoleato de metila. **FONTE:** DANTAS *et al.*, 2011 [76].





Ácidos carboxílicos na faixa de um a onze átomos de carbono foram identificados através de um estudo de oxidação em oito fontes de triacilgliceróis de diferentes oleaginosas. Dois testes relevantes para o teor de acidez e de corrosão do motor estão ligados ao biodiesel: o índice de acidez (IA) limitado a  $0,50 \text{ mg KOH g}^{-1}$  e a tira de teste de corrosão de cobre, que envolve o exame de tiras calibradas colocadas no combustível durante 3 h a  $50^\circ\text{C}$  [77].

A deterioração por oxidação produz contaminantes que comprometem a qualidade do biodiesel e o desempenho do motor por combustão interna. Os hidroperóxidos, dímeros e polímeros formados pelo processo oxidativo contribuem para o aumento da viscosidade, além de conduzir à formação de depósitos insolúveis, que provocam problemas como a obstrução do filtro de combustível, gerando problemas no funcionamento do motor. De igual modo, nesse mesmo processo oxidativo os ácidos graxos livres de cadeias menores podem ser gerados, que favorecem o aumento da acidez [78,79].

Além da deterioração por hidrólise e por oxidação, os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) podem sofrer deterioração na presença de microrganismo. No processo de deterioração, os FAME podem ser degradados a ácidos graxos de cadeia menor [80].

Prince, Haitmanek & Lee (2008) [81] relataram um estudo de biodegradação de uma mistura entre diesel/biodiesel na proporção de 80:20 (B20) por microrganismos. Os experimentos utilizaram uma concentração de 100 ppm (volume) de B20, que está na faixa normalmente utilizada em ensaios legais de biodegradação, tais como o Teste 301 recomendado pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (1993). A degradação da composição química da mistura diesel/biodiesel foram monitoradas por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS).

De igual modo, Demello *et al.*, (2007) [82] estudaram a biodegradação microbiológica de misturas de diesel/biodiesel para verificar o comportamento no ambiente marinho. Amostras de água do mar foram enriquecidas com 100% de diesel fóssil, B8, B25 e B100. As amostras individuais foram coletadas ao longo de 53 dias e analisadas por cromatografia gasosa (GC). Comparar a taxa de degradação relativa dos ésteres metílicos de ácidos graxos em relação aos componentes do diesel fóssil foi um dos objetivos propostos pelos autores.

## 1.5 Técnicas instrumentais em análises de biodiesel

### 1.5.1 Cromatografia gasosa (GC)

A técnica de cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID) é sugerida pelas normas EN 14103 e NBR 15764 para determinação do teor total de ésteres. Embora a GC-FID seja a principal técnica para caracterizar os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) oriundos da reação de transesterificação de óleos vegetais, são necessários padrões analíticos de cada FAME para confirmar os resultados [83].

Dignac *et al.*, (2000) [84] com a técnica de GC-FID, analisaram a composição orgânica de águas residuais da ETE da cidade de Compiègne (França). No estudo eles caracterizaram os principais ácidos graxos dos triacilgliceróis presentes nas águas residuais.

### 1.5.2 Espectrometria de Massas

#### 1.5.2.1 Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS)

Na ausência de padrões analíticos de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) necessários para identificação de FAME oriundo de óleo vegetal ou gordura animal por GC-FID, a técnica de cromatografia gasosa/espectrometria de massas se torna uma ferramenta viável para elucidar as estruturas de FAME, pois a identificação dos ésteres pode ser realizada pela comparação e interpretação do espectro de massas do analito com o espectro de massas reportado em espectroteca como a do NIST 05 [83].

#### 1.5.2.2 Ionização por *electrospray*/espectrometria de massas (ESI-MS)

A análise direta sem pré-separação na caracterização de óleos vegetais e gordura animal tem sido realizada por espectrometria de massas [85]. Wu *et al.*, (2004) [86] utilizando a técnica de espectrometria de massas por

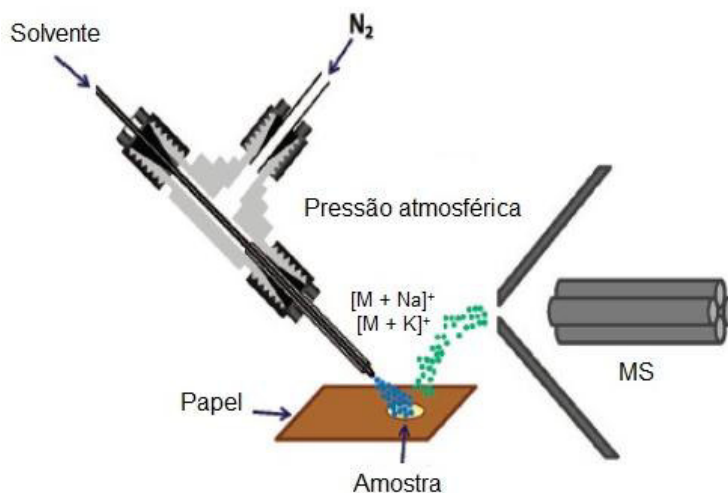
ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier e ionização por *electrospray* (ESI-FT-ICR-MS), caracterizaram os componentes dos óleos refinados de canola, de oliva e de soja. Esses foram distinguidos de acordo com a distribuição de compostos das classes químicas, que foram FFA, di e triacilgliceróis e tocoferóis.

Catharino *et al.*, (2007) [87] utilizando a técnica de infusão direta por ESI-MS de extratos aquosos/metanólicos nos modos de ionização positivo e negativo, fizeram um estudo dos perfis e do controle de qualidade de biodiesel a partir de diferentes fontes de óleo, tais como, soja, girassol, canola, oliva, mamona, pinhão manso, palma e banha de porco.

#### 1.5.2.3 Ionização ambiente por *sonic-spray*/espectrometria de massas (EASI-MS)

A técnica de EASI-MS foi introduzida como uma nova técnica de ionização, caracterizada pela simplicidade e pela utilização direta (sem pré-separação ou derivatização da amostra), sendo capaz de analisar, em pouco tempo, uma variedade de compostos orgânicos de diferentes classes químicas, como ésteres, ácidos carboxílicos, fenóis etc [88]. A Figura 6 ilustra o esquema de uma análise de biodiesel por EASI-MS.

**Figura 6** – Esquema do sistema utilizado na análise de biodiesel por EASI-MS.  
**FONTE:** ABDELNUR, *et al.*, 2008 [89].



A EASI pertence a um grupo conhecido como uma técnica de dessorção/ionização ambiente para análise por espectrometria de massas. Para a análise de óleos e biodiesel por EASI-MS, uma única gota de amostra é colocada numa superfície inerte (uma folha de papel, por exemplo), e a análise é realizada sob condições ambiente sem riscos de oxidação da amostra. A técnica de EASI-MS tem sido aplicada com sucesso na análise do perfil de triacilgliceróis, de hidroperóxidos, de triacilgliceróis, de óleos vegetais e de amostras de biodiesel [90].

A ionização ambiente por *sonic-spray* é realizada com auxílio de gás nitrogênio e gera em um solvente polar, através da pulverização sônica, uma nuvem de gotículas com uma corrente bipolar de gotículas minúsculas carregadas, que ao bombardear a superfície da amostra neutra, transformam os compostos em íons, que em seguida são transferidos para a fase gasosa, e direcionados ao analisador de massas. Na análise por EASI não há necessidade de se utilizar aquecimento nem tensão no capilar de pulverização [91].

Santos *et al.*, (2016) [92] relataram em seu trabalho que a aplicação da EASI-MS, no modo de ionização positivo e no modo negativo, é capaz de caracterizar e diferenciar óleos oriundo de diferentes oleaginosas, tais como: *Jatropha curcas*, *Bombacopsis glabra*, *Capparis flexuosa*, *Siparuna guianensis*, *Moringa oleifera*, *Hibiscus tiliaceus*, *Virola bicuhyba*, *Pouteria caimito* e *Syagrus coronata*. Nestes óleos foram obtidos perfis com diferenças consideráveis de triacilgliceróis e ácidos graxos livre, que forneceram informações importantes sobre o controle de qualidade e aplicações potenciais destes óleos.

Pereira *et al.*, (2014) [93] desenvolveram um estudo para avaliar a capacidade da EASI-MS em detectar um conjunto abrangente de produtos de oxidação primário (hidroperóxidos) e secundário (dímeros) provenientes do biodiesel dos óleos de soja e de canola.

### 1.5.3 Análise Termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica é utilizada para avaliar a estabilidade térmica e oxidativa de óleos e do biodiesel [94–97]. Na Tabela 4, estão

apresentadas as faixas de temperaturas em que ocorrem a volatilização ou decomposição dos componentes do biodiesel.

**Tabela 4** – Perda de massas em função da temperatura dos compostos comuns encontrados no biodiesel por análise termogravimétrica. **FONTE:** ÇAYLI & KÜSEFOĞLU, 2008 [98].

Compostos	Faixa de temperatura para perda de massa (°C)
Oleato de metila	198-205
Glicerina	195
Ácido oleico	210-220
Monoacilglicerol	230-240
Diacilgliceróis	360-380
Triacilgliceróis	405-415

Zhã *et al.*, (2012) [99] investigaram alguns aspectos do biodiesel proveniente do óleo de soja, tais como: estabilidade térmica, oxidação e absorção de umidade, utilizando a termogramivetria. O perfil térmico do biodiesel de óleo de soja sintetizado pelo grupo de pesquisa foi comparado com um biodiesel comercial.

Kok & Topa (2015) [100] realizaram um estudo para determinar as características térmicas e cinéticas da amostra de biodiesel proveniente do óleo de canola, a fim de investigar a aplicabilidade do biodiesel como fonte de energia, usando técnicas de análise térmica como a termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial. Farias *et al.*, (2016) [101] avaliaram a aplicação da mistura de biodieseis oriundos do óleo de mamona, óleo de babaçu e sebo bovino em um biodiesel etílico do óleo de soja como um aditivo (<5%), de modo a melhorar a estabilidade térmica e oxidativa.

Vega-Lizama *et al.*, (2015) [102] utilizaram a termogravimetria para determinar o grau de oxidação do biodiesel derivado do óleo de soja refinado exposto a atmosfera de oxigênio. Com base na massa residual da curva termogravimétrica, foi determinado o percentual de compostos gerados na oxidação do biodiesel. Para isso, utilizaram a diferença entre a temperatura de

volatilização ou decomposição térmica dos ésteres e dos produtos de oxidação do biodiesel.

### **1.6 Determinação de compostos polares totais em amostra de óleo residual utilizando cromatografia em coluna aberta de sílica**

A reação de transesterificação, quando incompleta, aplicada na produção de biodiesel, leva a existência de subprodutos residuais, tais como: ácidos graxos livres (FFA), mono, di e triacilgliceróis. A presença de mono, di e triacilgliceróis e FFA como parte da composição química do biodiesel pode causar problemas de depósitos e de corrosão do motor. Portanto, é necessário desenvolver um método para separar esses contaminantes do biodiesel [73].

HUANG *et al.*, (2015) [103] aplicaram o método de cromatografia em camada delgada para separação de mono, di, triacilgliceróis, FFA e FAMES em amostras de biodiesel provenientes de óleo residual de fritura, óleo de palma e óleo de soja, assim como, uma amostra obtida comercialmente.

CHEN *et al.*, (2013) [104] utilizaram a cromatografia em coluna aberta para determinar o teor de compostos polares totais em amostras de óleos vegetais (óleo de soja e de palma), ambos submetidos ao processo de fritura de batatas fritas, filé de frango e costela de porco.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Caracterizar os contaminantes residuais que são gerados após a produção de misturas ésteres de fontes alternativas de triacilgliceróis com vistas a obtenção de biodiesel.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Obter amostras de misturas de ésteres metílico e etílico de fontes alternativas de triacilgliceróis por transesterificação catalisada por base;
- Caracterizar as misturas de ésteres pela técnica de cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS);
- Determinar o teor de ésteres das amostras de misturas de ésteres baseado na norma NBR 15764;
- Determinar o teor de compostos polares totais nas amostras de misturas de ésteres por cromatografia em coluna aberta pelo método 2-507, indicado pela IUPAC para óleos vegetais;
- Elucidar os ésteres e os contaminantes presentes nas amostras de misturas de ésteres por EASI-MS nos modos positivo e negativo;
- Caracterizar as amostras de misturas de ésteres e a fração apolar obtida pelo método 2-507 por análise termogravimétrica;
- Determinar o índice de acidez e o índice de peróxidos das amostras de misturas de ésteres;
- Otimizar o método 2-507 para determinação do teor de contaminantes em amostras de misturas de ésteres;
- Determinar o teor de ésteres das amostras de misturas de ésteres e da fração representativa dos ésteres obtida pelo método 2-507 otimizado por GC-FID.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção das amostras de mistura de ésteres

Cinco amostras de biodiesel foram analisadas neste trabalho e denominadas mistura de ésteres (AME), uma vez que o termo biodiesel somente pode ser usado para um produto que atenda a todos os critérios definidos pela ANP. Foi realizada a reação de transesterificação metílica ou etílica para obtenção das AME ilustradas na Tabela 5. As amostras foram armazenadas sob atmosfera de nitrogênio.

**Tabela 5** – Matérias-primas utilizadas na produção das amostras de misturas de ésteres.

Matéria-prima	Nomenclatura da amostra de AME
Óleo residual de fritura <sup>a</sup>	OF ou OFE
Escuma de esgoto <sup>a</sup>	EE
Gordura da caixa de gordura <sup>a</sup>	GCG
Óleo da semente de algodão <sup>b</sup>	OSA

a = amostra cedida pela ECO 100; b = amostra cedida pelo Centro de Tecnologias do Nordeste; OF = mistura de ésteres metílicos oriundo do óleo residual de fritura; OFE = mistura de ésteres etílicos oriundo do óleo residual de fritura; EE = mistura de ésteres metílicos oriundo da escuma de esgoto; GCG = misturas de ésteres metílicos oriundo da gordura da caixa de gordura; OSA = misturas de ésteres metílicos oriundo da semente do óleo de algodão.

Com exceção da amostra OSA, as demais foram produzidas pela empresa ECO100 Desenvolvimento Sustentado Ltda. sediada no Rio de Janeiro-RJ. A Companhia Estadual de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro – CEDAE-RJ, forneceu a escuma de esgoto à empresa ECO 100 para produção da amostra EE.

A amostra OSA foi produzida pela usina do Centro de Tecnologias do Nordeste – CETENE, em Caetés-PE.

A Figura 7 ilustra a Companhia Estadual de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro-RJ.



**Figura 7** – Companhia Estadual de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro-RJ. **FONTE:** CEDAE, 2016 [105].



### 3.2 Determinação do teor de ésteres por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID)

#### 3.2.1 *Preparo das soluções das misturas de ésteres e da curva analítica*

O intervalo da concentração da curva analítica e da concentração das AME foi determinado com base na norma NBR 15764:2009 [67].

A determinação do teor de ésteres das amostras apresentadas neste trabalho foi realizada por padronização externa, empregando o oleato de metila ( $C_{18:1}$ , da marca Sigma Aldrich, com pureza de 99%) como padrão externo. Para o estudo foi preparada uma curva analítica conforme procedimento abaixo:

- Curva analítica: foi preparada uma solução estoque na concentração de  $100 \text{ mg mL}^{-1}$  do padrão  $C_{18:1}$ , e a partir dessa foram preparadas cinco a partir da solução estoque nas concentrações (6,0; 9,0; 12,0; 15,0 e  $18,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ), empregando-se n-heptano como solvente, da marca Baker, com pureza de 99%.

Para a análise das soluções de cada AME foram preparadas soluções que expressem aproximadamente o ponto médio da curva analítica, assim as soluções foram preparadas com uma concentração de aproximadamente 10 mg mL<sup>-1</sup> em n-heptano. Para o preparo da solução das AME, foi medida aproximadamente 10 mg em balão volumétrico de 1 mL de capacidade e completado o volume com n-heptano, da marca Baker, com pureza de 99%.

### 3.2.2 Condições cromatográficas utilizadas na determinação do teor de ésteres das amostras de misturas de ésteres por GC-FID

O sistema empregado para determinação do teor de ésteres foi o GCXGC-FID, LECO/Agilent 7890A, operando no modo monodimensional. As colunas foram HP-5 MS (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano; 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm) no forno primário e DB-17 (50% fenil, 50% dimetilpolisiloxano; 1,5 m x 0,1 mm d.i., 0,1 µm) no forno secundário, ambas da marca *Agilent Technologies*. A programação da temperatura do forno primário foi de 50 °C (2 min), rampa de 15 °C min<sup>-1</sup> até 280 °C (11 min). A programação do forno secundário e do modulador foi a mesma do forno primário, porém com um acréscimo de 15 °C nas condições iniciais do forno secundário e do modulador. O injetor operou no modo *Programmed Temperature Vaporizing* (PTV), com programação de temperatura de 90 °C (3 min), rampa de 600 °C min<sup>-1</sup> até 280 °C (25 min) em modo *split* (1:50) e injeção de 1,0 µL de cada solução, empregando hidrogênio 5.0 como gás de arraste a um fluxo constante de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura do detector foi de 320 °C, utilizando uma proporção de N<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>:Ar comprimido de 30:40:450 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. A pureza do N<sub>2</sub> foi de 99,999%. As condições foram determinadas com base na norma EN 14103:2011 [68].

### 3.3 Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS) utilizada na identificação dos ésteres das amostras de misturas de ésteres (AME)

Nas análises por GC/MS, foram preparadas soluções das AME com concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup> em tetraidrofurano (THF), da marca Baker, com pureza de 98,8%. As análises qualitativas dessas amostras foram realizadas em um GC/MS da marca Shimadzu (Quioto, Japão), modelo GCMS-QP2010 Ultra, de acordo com as condições apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6** – Parâmetros cromatográficos aplicados nas análises das amostras de misturas de ésteres por GC/MS.

Parâmetros cromatográficos	Descrição
Coluna	Rtx-5MS (5% difenil, 95% dimetil polissiloxano) com 30 m, 0,25 mm DI, 0,25 µm
Programação da temperatura do forno	50 °C (3 min); 18 °C até 160 °C; 4 °C até 280 °C (5 min)
Tipo de Injetor	<i>split/splitless</i>
Modo de operação	<i>split</i> (1:30)
Temperatura do injetor	280 °C
Gás de arraste	Hélio (99,999%)
Fluxo do gás de arraste	1,20 mL min <sup>-1</sup>
Temperatura da interface	300 °C
Fonte de ionização	Ionização por elétrons (70 eV)
Temperatura da fonte de íons	200 °C
Volume de injeção	1,0 µL
Tempo de análise	44,11 min

As soluções foram analisadas no modo de varredura linear (SCAN) na faixa de 40 a 550 Daltons.

A identificação dos ésteres das AME foi realizada pela comparação dos espectros de massas dos ésteres e dos espectros de massa da espectroteca NIST 05 e pela comparação do tempo de retenção da análise de uma solução padrão de FAME da Supelco, código 47885-U, na concentração de aproximadamente  $290,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  sob as mesmas condições de análise das AME, com exceção do modo de operação do injetor, pois, para o padrão de FAME, ele foi operado no modo *splitless* (1 min).

### **3.4 Determinação dos compostos polares totais (CPT) presentes nas amostras de misturas de ésteres por cromatografia em coluna aberta de sílica (CC)**

Para a determinação dos CPT presentes nas amostras de misturas de ésteres, foi utilizado o método padronizado 2-507 de cromatografia em coluna aberta de sílica, indicado para óleos vegetais desde 1987 pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) [106]. O esquema básico para separação dos CPT é ilustrado na Figura 8.

#### **3.4.1 Empacotamento da coluna aberta de sílica aplicada na determinação dos CPT presentes nas AME**

Em uma coluna de vidro de 10 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento, foi inserido um plugue de algodão na parte inferior. Sílica gel (60) da Macherey-Nagel (sílica gel 60, 70-230 *mesh* ASTM) foi previamente ativada a uma temperatura de  $400\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante quatro horas em mufla. Em seguida, foi deixada em repouso por uma hora no dessecador. Aproximadamente 5 g de sílica ativada foi medida e desativada adicionando-se 5% (m/m) de água destilada sob constante agitação a 100 rotações por minutos (rpm) durante 10 min. Logo após, essa massa foi introduzida na coluna com 20 mL de metanol, da marca Baker, com pureza de 99,9%, em forma de suspensão, que auxiliou no empacotamento. Em seguida, foi realizada uma lavagem com 25 mL de uma solução Hexano/Éter etílico (9:1), a fim de mudar a característica da fase móvel, ambos da marca Tedia, com pureza de 95 e 99,9%, respectivamente.

### 3.4.2 Eluição dos compostos polares totais presentes nas amostras de misturas de ésteres

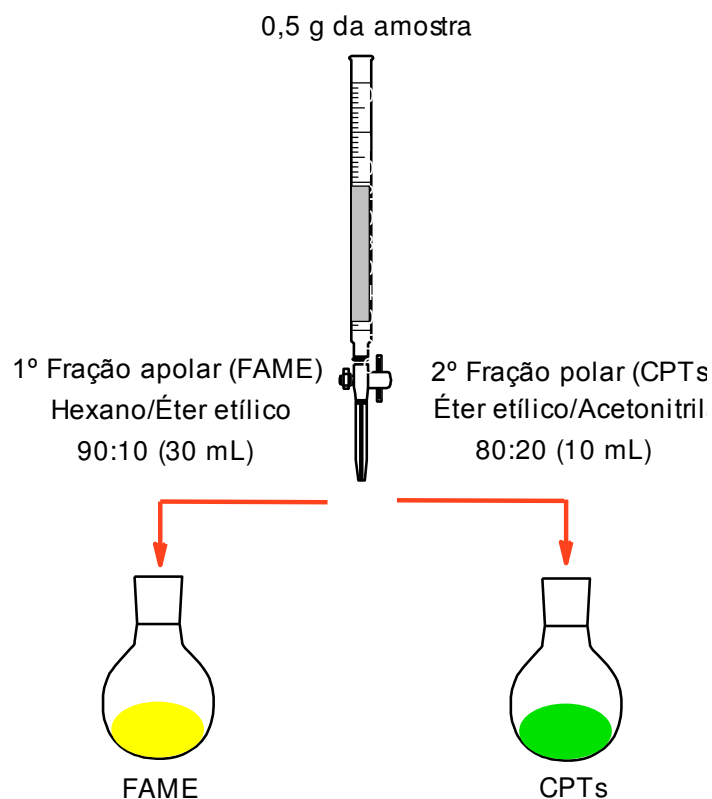
Com auxílio de uma balança analítica, aproximadamente 0,5000 g da AME foi medida em um balão volumétrico de 10 mL, que teve seu volume completado com uma solução de Hexano/Éter etílico (9:1). Posteriormente, 4 mL da solução foram transferidos para o topo da coluna. Os compostos apolares foram eluídos com 30 mL da solução Hexano/Éter etílico (9:1) e na sequência os compostos polares com 10 mL de uma solução Éter etílico/Acetonitrila (8:2), acetonitrila da marca Tedia, com pureza de 99,9%. As frações foram recolhidas em balões de 100 mL de capacidade de junta esmerilhada previamente condicionado em estufa a 100 °C durante uma hora, então em dessecador durante uma hora, e em seguida teve sua massa inicial medida. Os solventes de ambas as frações foram evaporados no sistema de evaporador rotativo operando a 80 rpm com a temperatura do banho a 50 °C. Em seguida, foi deixado em estufa por uma hora a 100 °C. Logo após em dessecador por uma hora. As massa dos balões foram medidas e as porcentagens relativas em massa de ambas as frações foram calculadas. O teor de CPT foi determinado conforme a Equação 1.

**Equação 1** – Equação utilizada para calcular o percentual teórico de compostos polares totais.

$$CPT = \left( \frac{m - m_1}{m} \right) \times 100$$

Onde  $m$  é a massa proporcional da amostra em 4 mL e  $m_1$  é a da massa da fração apolar eluída com a solução Hexano/Éter etílico (9:1).

**Figura 8** – Separação esquemática dos compostos polares totais por cromatografia em coluna aberta. Adaptado de MÁRQUEZ-RUIZ, 2009 [107].



### 3.5 Análise termogravimétrica (TG) das amostras de misturas de ésteres

O perfil térmico das amostras de misturas de ésteres antes e após o processo de cromatografia em coluna aberta foi determinado em um equipamento da marca Shimadzu (Quioto, Japão), modelo TGA-50, utilizando nitrogênio 5.0 como gás de purga com fluxo de  $40 \text{ mL min}^{-1}$ . Aproximadamente 7,5 mg das amostras foram medidas e aquecidas da temperatura ambiente até  $900^\circ\text{C}$ , a uma taxa de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ .

### 3.6 Caracterização das amostras de misturas de ésteres por ionização ambiente por *sonic-spray*/espectrometria de massas (EASI-MS)

As amostras de misturas de ésteres foram analisadas por infusão direta no sistema EASI-MS, operando nos modos de ionização positivo e negativo,

utilizando um espectrômetro de massas do tipo mono-quadrupolo da Shimadzu (Quioto, Jopão), modelo LC2010. Para ambos os modos de ionização, uma alíquota da amostra (uma pequena gota, 2  $\mu\text{L}$ ) foi colocada diretamente sobre a superfície do papel a um ângulo de  $30^\circ$  para entrada no espectrômetro de massas, utilizando metanol a uma taxa de  $20 \mu\text{L min}^{-1}$  e nitrogênio como gás de nebulização com um fluxo de  $3 \text{ L min}^{-1}$  e 30 bar de pressão. Hidróxido de amônia 0,1% foi utilizado no modo de ionização negativo. As amostras foram analisadas no modo de varredura linear (SCAN) na faixa de  $m/z$  100-500 para o modo negativo e de  $m/z$  50-1000 para o modo positivo.

### **3.7 Determinação do índice de acidez das amostras de misturas de ésteres**

O índice de acidez das amostras de misturas de ésteres foi determinado pelo método ASTM D664 [108].

#### **3.7.1 Padronização da solução alcoólica de KOH**

Foi preparada uma solução de KOH (da marca Vetec, com pureza de 85%) em etanol (da marca Itajá, com pureza de 92,8%) na concentração de  $0,0500 \text{ mol L}^{-1}$ . A padronização foi realizada com 0,1000 g do padrão biftalato de potássio (da marca Neon, com pureza de 99,5%), dissolvido em 40 mL de uma solução de éter etílico:etanol:água destilada (2:1:2), três gotas de uma solução alcoólica de fenolftaleína a 1% foi utilizada como indicador. O procedimento foi realizado em duplicata. De igual modo, foi realizado uma titulação do branco, e o volume de KOH gasto foi subtraído do volume de KOH gasto na verificação.

#### **3.7.2 Índice de acidez**

Aproximadamente 0,5000 g da amostra de mistura de ésteres foi dissolvida em 25 mL de uma solução de éter etílico/etanol (2:1) em um

erlenmeyer de 125 mL e titulada com a solução alcoólica de KOH padronizada ( $0,0474 \pm 0,0001$ ) mol L<sup>-1</sup>, utilizando solução alcoólica indicadora de fenolftaleína a 1%. Da mesma maneira, foi realizada uma titulação do branco, e o volume da solução de KOH gasto na titulação do branco foi subtraído do volume gasto na titulação da amostra. O índice de acidez é expresso em mg KOH g<sup>-1</sup> de amostra e pode ser calculado pela Equação 2.

**Equação 2** – Equação utilizada para o cálculo do índice de acidez nas amostras de misturas de ésteres.

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{(V_{\text{amostra}} - V_{\text{branco}}) \times C \times MM}{m}$$

Onde:

$V_{\text{amostra}}$  = volume em mL da solução de KOH gastos na titulação da amostra;

$V_{\text{branco}}$  = volume em mL da solução de KOH gastos na titulação do branco;

C = concentração da solução de KOH 0,0474 mol L<sup>-1</sup>;

MM = massa molecular de KOH;

m = massa da amostra de mistura de ésteres.

### 3.8 Caracterização dos ácidos graxos livres presentes nas amostras de misturas de ésteres (AME) por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS)

Foi preparada uma solução estoque de 50 mg mL<sup>-1</sup> em tetrahidrofurano (THF) de cada AME. Desta solução, 50 µL foram transferidos para um *insert* de 200 µL de capacidade e, em seguida, foram adicionados 50 µL do agente derivatizante N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), marca Supelco, permanecendo em estufa durante 20 min a 60 °C. As análises qualitativas dessas amostras foram realizadas em GC/MS da Shimadzu (Quioto, Japão),



modelo GCMS-QP2010 Ultra, de acordo com as condições apresentadas na Tabela 6 do item 3.3, com exceção da razão de *split* que foi alterada para 1:50.

### 3.9 Determinação do índice de peróxido das amostras de misturas de ésteres

O índice de peróxido nas amostras de misturas de ésteres foi determinado pelo método da *American Oil Chemistry Society* (AOCS) Cd 8-53 [109].

#### 3.9.1 Padronização da solução de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )

Foi preparada uma solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (99,5% de pureza) na concentração de aproximadamente 0,1000 N e adicionado 0,5 mL de clorofórmio (da marca Isofar, com pureza de 99,8%). A padronização em duplicata foi realizada com 0,1500 g do padrão primário dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) dissolvido em 50 mL de água destilada, com adição de 2 g de iodeto de potássio dissolvido em 20 mL de água destilada e adição de 8 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. O iodo liberado foi titulado com a solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

#### 3.9.2 Índice de peróxido

Em um erlenmeyer de 125 mL aproximadamente 0,5000 g da AME foi medida e dissolvida com 15 mL de ácido acético glacial (da marca Synth, com pureza de 99,7%) e clorofórmio na proporção de (3:2). Logo após, foi adicionado 0,5 mL de uma solução de iodeto de potássio (da marca Neon, com pureza de 99,5%) a 10%, deixando em repouso por um minuto. Posteriormente, 15 mL de água destilada e 0,5 mL de indicador (solução de amido a 1%) foram adicionadas. Em seguida, foi titulado sob agitação constante com a solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , que após a padronização apresentou concentração de  $0,0984 \pm 0,0006$  N, até o desaparecimento da coloração azul.

Da mesma maneira, foi realizado uma titulação do branco, e o volume de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gasto na titulação do branco foi subtraído do volume de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gasto na titulação da AME. O Índice de peróxido é expresso em  $\text{meq kg}^{-1}$  de amostra e pode ser calculado pela Equação 3.

**Equação 3** – Equação utilizada para o cálculo do índice de peróxido nas amostras de misturas de ésteres.

$$\text{Índice de peróxido} = \frac{(V_{\text{amostra}} - V_{\text{branco}}) \times N \times 1000}{m}$$

Onde:

$V_{\text{amostra}}$  = volume em mL da solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastos na titulação da amostra;

$V_{\text{branco}}$  = volume em mL da solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastos na titulação do branco;

$N$  = normalidade da solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ;

$m$  = massa da amostra de mistura de ésteres em g.

### **3.10 Otimização do processo de cromatografia em coluna aberta 2-507 para determinação do teor de contaminantes em amostras de misturas de ésteres**

O método 2-507 [106] de cromatografia em coluna aberta, inicialmente proposto para determinação de compostos polares totais em amostra de óleos vegetais, foi otimizado para determinação de contaminantes em amostras de misturas de ésteres citadas na Tabela 5. Foram realizados 10 ensaios, modificando o diâmetro interno da coluna, os solventes utilizados na eluição da fração apolar representativa dos ésteres e o tipo de adsorvente. O empacotamento da coluna foi realizado conforme está descrito no item 3.4.1 e a eluição dos contaminantes conforme está descrito no item 3.4.2 com duas alterações: 1) nos ensaios para otimização do método 200 mg da amostra

foram dissolvidas com 2 mL do solvente de eluição da fração apolar e transferida para o topo da coluna, 2) os balões utilizados na coleta das frações (apolar e polar) não foram submetidos à estufa a 100 °C por 1 h. Por apresentar um baixo teor de ésteres ( $77,90 \pm 3,30$ ), a amostra GCG foi utilizada em todos os ensaios realizados para otimização do método. A Tabela 7 mostra os ensaios realizados para otimizar o método 2-507, sendo a otimização alcançada no décimo ensaio.

**Tabela 7** – Ensaios realizados na otimização do método 2-507 [106] para determinação de contaminantes em amostras de misturas de ésteres.

Ensaios realizados na otimização do método 2-507						
Ensaio	Volume para empacotamento (mL)	Volume para eluição dos ésteres (mL)	Volume para eluição dos contaminantes (mL)	Diâmetro interno da coluna (mm)	Massa de adsorvente (g)	Massa da amostra (mg)
1º	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	10 <sup>e</sup>	0,8	5 (SiO <sub>2</sub> )	200
2º	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> )	200
3º	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 1:1) <sup>h</sup>	200
4º	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 1:1) <sup>i</sup>	200
5º	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 9:1) <sup>j</sup>	200
6º	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	10 <sup>f</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 9:1) <sup>i</sup>	200
7º	20 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> )	200
8º	20 <sup>b</sup>	30 <sup>c</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> )	200
9º	15 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> )	200
10º	15 <sup>g</sup>	30 <sup>g</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> )	200

**a** = solução de hexano/éter etílico (9:1); **b** = hexano; **c** = solução de hexano/diclorometano (9:1); **e** = solução de éter etílico/acetonitrila (8:2); **f** = metanol; **g** = solução de hexano/diclorometano (7:3); **h** = Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na parte inferior da coluna e SiO<sub>2</sub> na parte superior da coluna; **i** = Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na parte superior da coluna e SiO<sub>2</sub> na parte inferior; **j** = adsorventes misturados.

### **3.11 Determinação do teor de ésteres por GC-FID em amostras de misturas de ésteres e da fração apolar obtida pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta**

Foi aplicado o mesmo procedimento do item 3.2.1 no preparo da curva analítica, nas soluções das amostras de misturas de ésteres e na fração apolar obtida pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta no item 3.10. As análises quantitativas foram realizadas em um GCXGC-FID, LECO/Agilent 7890A, operando no modo monodimensional de acordo com as condições apresentadas na Tabela 8.

**Tabela 8** – Condições cromatográficas aplicadas na determinação do teor de ésteres por GC-FID das amostras de misturas de ésteres e da fração apolar obtida pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta.

Parâmetros cromatográficos	Descrição
Coluna no forno primário	SP2380 (90% biscianopropil, 10% cianopropil siloxano) com 30 m, 0,25 mm d.i, 0,20 $\mu\text{m}$
Coluna no forno secundário	SLB-5MS (5% fenil, 95% dimetil polisiloxano) com 1,0 m, 0,1 mm d.i, 0,1 $\mu\text{m}$
Programação da temperatura do forno primário	50 $^{\circ}\text{C}$ (3 min); 25 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 190 $^{\circ}\text{C}$ ; 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 260 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)
Programação da temperatura do forno secundário	70 $^{\circ}\text{C}$ (3 min); 25 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 210 $^{\circ}\text{C}$ ; 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 280 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)
Programação da temperatura do modulador	85 $^{\circ}\text{C}$ (3 min); 25 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 225 $^{\circ}\text{C}$ ; 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 295 $^{\circ}\text{C}$ (5 min)
Tipo de Injetor	Temperatura programada de vaporização (PTV)
Programação da temperatura do injetor	90 $^{\circ}\text{C}$ (3 min); 600 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 260 $^{\circ}\text{C}$ (17 min)
Modo de operação do injetor	<i>split</i> (1:50)
Volume de injeção	1,0 $\mu\text{L}$
Gás de arraste	Hidrogênio (99,999%)
Fluxo do gás de arraste	1,0 $\text{mL min}^{-1}$
Temperatura do detector	320 $^{\circ}\text{C}$
Proporção dos gases utilizados na chama do FID	$\text{N}_2:\text{H}_2:\text{Ar}$ comprimido (30:40:450 $\text{mL min}^{-1}$ )
Tempo de análise	20,6 min

### 3.12 Limpeza de vidrarias e armazenamento de resíduos orgânicos

Após o uso, as vidrarias foram submersas em uma solução aquosa de detergente neutro a 10% da marca Atol e deixadas em repouso durante 6 h. Após o repouso, elas foram lavadas e enxaguadas com água corrente fornecida pelo Departamento de Saneamento de Sergipe (Deso), e, em seguida, as vidrarias foram sequencialmente lavadas com água destilada, etanol e hexano.

Os resíduos orgânicos gerados durante o desenvolvimento do trabalho foram armazenados em recipientes de plástico de 50 L de acordo com as suas classificações químicas. Os solventes orgânicos armazenados foram devidamente separados entre solvente orgânico clorado e não clorado.

Em frascos de vidro de 4 L, de cor âmbar, o resíduo de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) gerado neste trabalho foi armazenado junto ao resíduo de  $K_2Cr_2O_7$  das aulas práticas de preparação e padronização de tiosulfato de sódio, do Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Química, da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

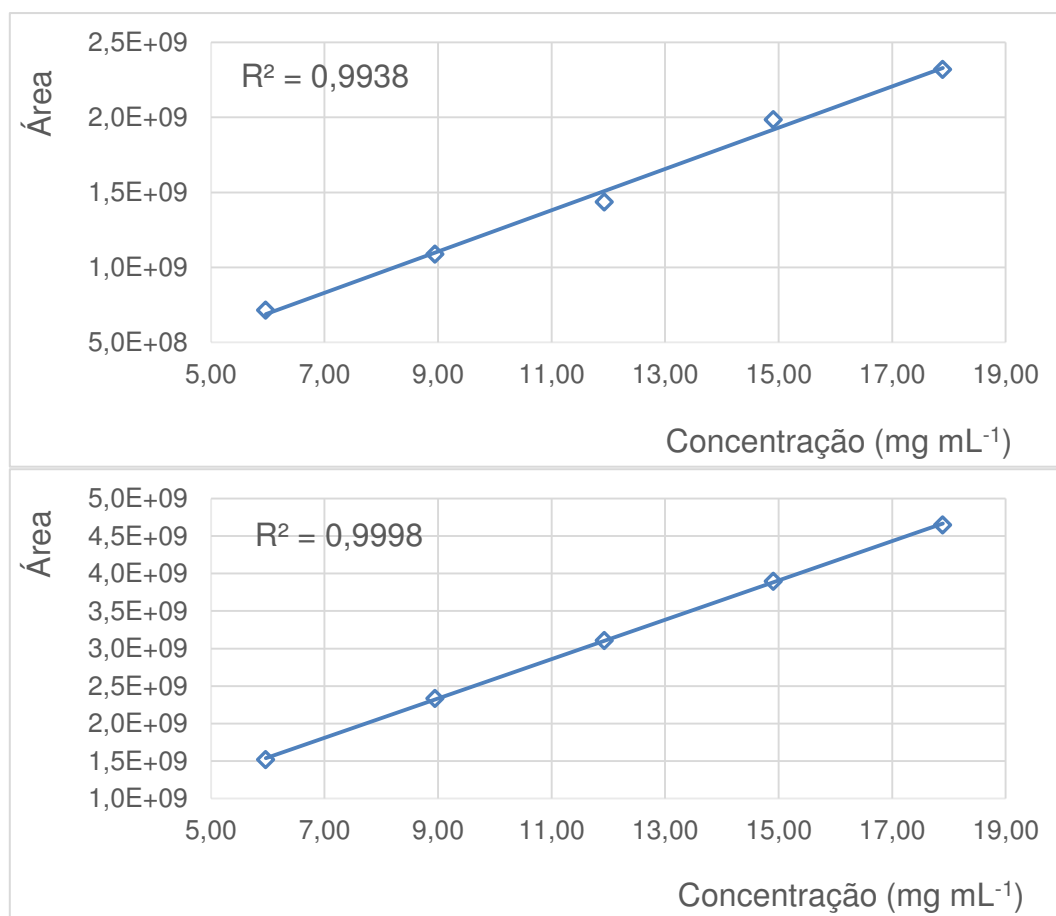
### 4.1 Teor de ésteres determinado em amostras de misturas de ésteres por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (GC-FID)

No Brasil, o controle da qualidade do biodiesel é fiscalizado pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Segundo a ANP, a determinação do teor de ésteres pode ser feita seguindo a metodologia EN 14103 ou NBR 15764. O teor de ésteres baseado na EN 14103 é realizado por padronização interna com o heptadecanoato de metila ( $C_{17:0}$ ) e só considera os ésteres de cadeia a partir do  $C_{14:0}$  ao  $C_{24:1}$  no cálculo do teor de ésteres. No entanto, é relatado na literatura que alguns biodieseis derivados de óleos vegetais possuem ácidos graxos com cadeias menores que o  $C_{14:0}$ , e gorduras animais podem apresentar o  $C_{17:0}$  na sua composição o que torna inviável o uso do  $C_{17:0}$  como padrão interno [110].

A metodologia da NBR 15764 é uma versão equivalente a norma EN 14103, na qual a quantificação do teor de ésteres pode ser realizada utilizando padronização externa. Vale ressaltar que na metodologia NBR 15764 o biodiesel pode ser considerado com ésteres que variam no tamanho da cadeia entre o  $C_{8:0}$  ao  $C_{24:0}$ . O teor de ésteres foi sempre determinado com uma curva analítica do padrão externo oleato de metila ( $C_{18:1}$ ) recém preparada. Como exemplo, a Figura 9 ilustra duas curvas analítica do  $C_{18:1}$  em diferentes dias de análise, mostrando a linearidade da curva analítica obtida por padronização externa neste trabalho. A Tabela 9 apresenta os teores de ésteres das AME determinados por padronização externa.



**Figura 9** – Curvas analíticas do C<sub>18:1</sub> utilizadas para quantificar o teor de ésteres das amostras de misturas de ésteres pela técnica de GC-FID.



**Tabela 9** – Teores de ésteres das amostras de misturas de ésteres quantificadas por padronização externa utilizando GC-FID.

Amostras	% Teor de ésteres (m/m)*	Desvio padrão (s)
OF	78,82	3,74
EE	70,38	0,18
GCG	73,58	2,37
OFE	90,80	1,06
OSA	86,73	0,96

\*n = 2

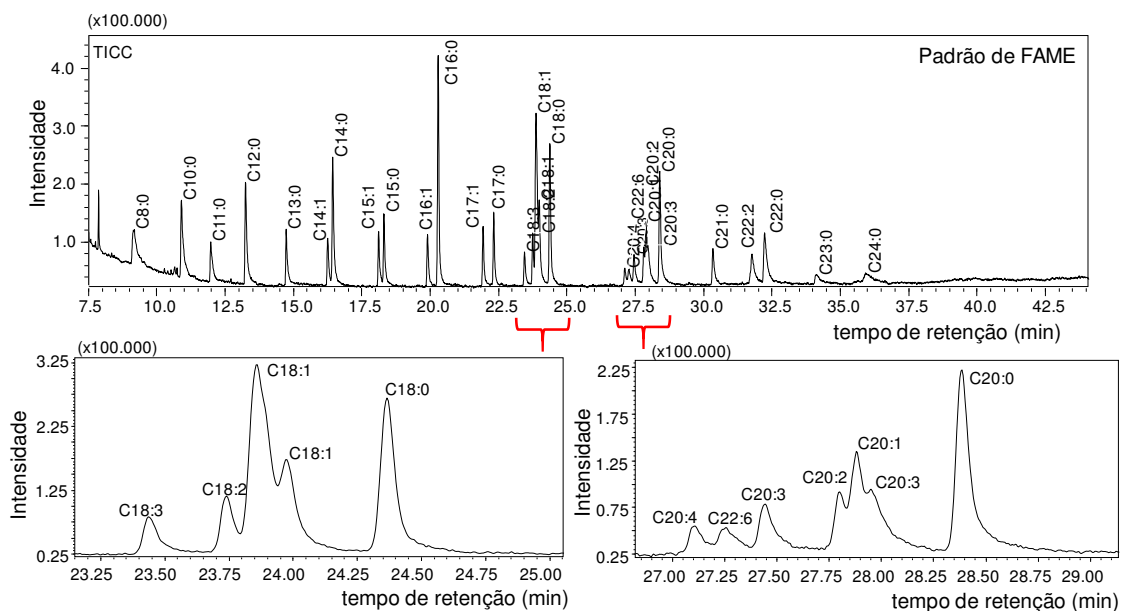
A ANP estabelece o teor mínimo de ésteres de 96,5% (m/m) em amostras de biodiesel [63]. Conforme os dados da Tabela 9, foi observado que as amostras apresentaram valores abaixo do mínimo estabelecido, o que denota a necessidade da caracterização geral das amostras, compreendendo a

identificação dos ésteres e dos contaminantes que levam a não conformidade do produto com as especificações exigidas pela ANP.

## 4.2 Caracterização dos ésteres nas amostras de misturas de ésteres por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS)

Para caracterizar os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) nas amostras de misturas de ésteres (AME), primeiramente, uma solução padrão de FAME, da marca Supelco, na concentração de  $291,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi analisada por GC/MS. Na Figura 10 é mostrado o cromatograma da corrente total de íons (TICC) da solução padrão de FAME, da qual foram feitas ampliações para avaliar as regiões do cromatograma. A Tabela 10 apresenta o resultado da análise.

**Figura 10** – TICC da solução padrão de FAME da Supelco analisada por GC/MS. Para condições cromatográficas de análise, ver item 3.3.



**Tabela 10** – Dados cromatográficos da análise da solução padrão de FAME da marca Supelco analisados por GC/MS.

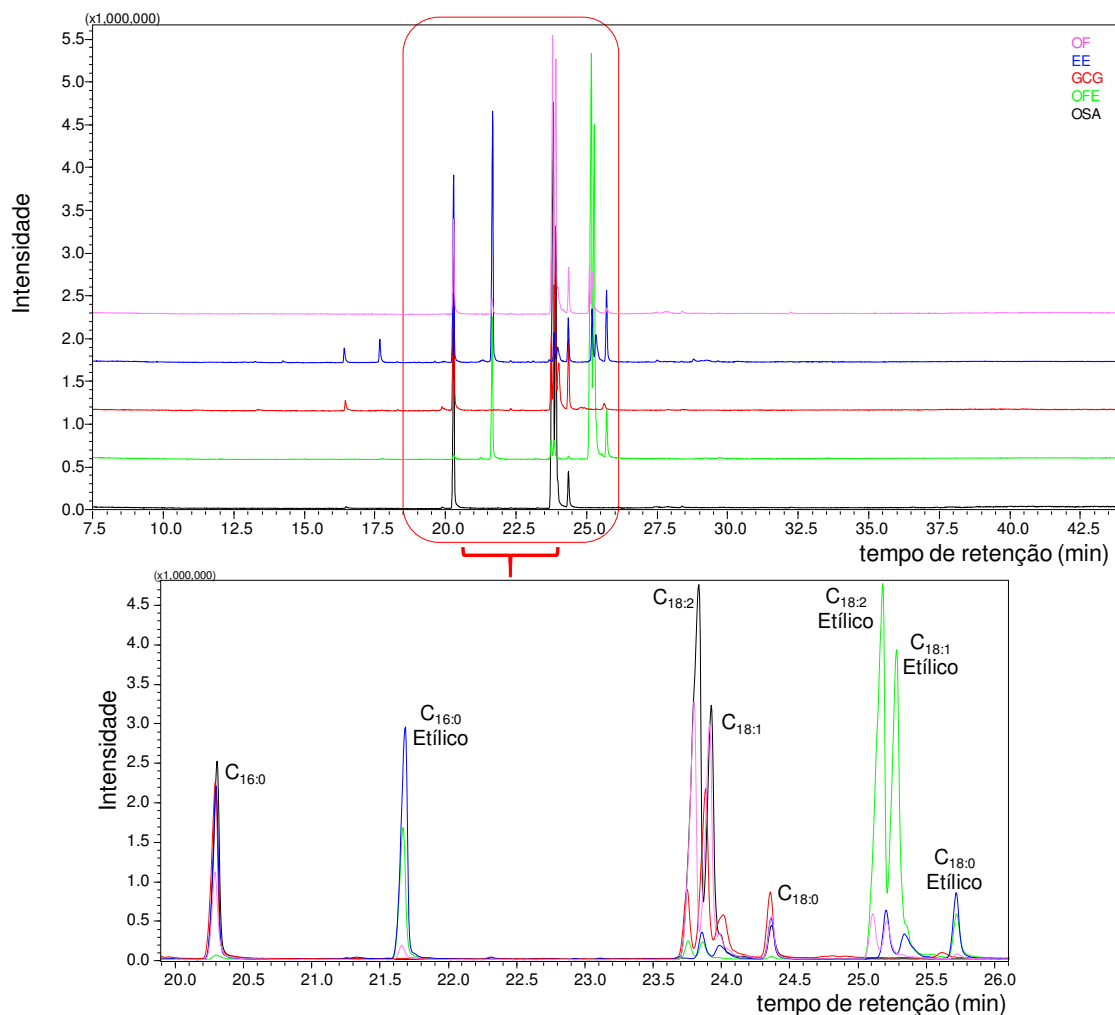
Nome comum	Nome IUPAC	Tempo de retenção (min)	Esqueleto $C_{nC:nl}$	Área relativa (%)
Caprílato de metila	Octanoato de metila	9,170	$C_{8:0}$	2,94
Cáprato de metila	Decanoato de metila	10,889	$C_{10:0}$	4,18
-	Undecanoato de metila	11,962	$C_{11:0}$	2,43
Laurato de metila	Dodecanoato de metila	13,235	$C_{12:0}$	5,61
-	Tridecanoato de metila	14,722	$C_{13:0}$	2,66
Miristoleato de metila	9-cis-tetradecenoato de metila	16,238	$C_{14:1}$	2,15
Mirístato de metila	Tetradecanoato de metila	16,423	$C_{14:0}$	6,26
-	cis-10-pentadecenoato de metila	18,102	$C_{15:1}$	2,42
-	Pentadecanoato de metila	18,299	$C_{15:0}$	3,01
Palmitoleato de metila	cis-9-hexadecenoato de metila	19,890	$C_{16:1}$	2,26
Palmitato de metila	Hexadecanoato de metila	20,279	$C_{16:0}$	10,09
-	cis-10-heptadecenoato de metila	21,921	$C_{17:1}$	2,50
Margarato de metila	Heptadecanoato de metila	22,314	$C_{17:0}$	3,17
Linolenato de metila	Cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoato de metila	23,436	$C_{18:3}$	1,45
Linoleato de metila	cis, cis-9-12-octadecadienoato de metila	23,740	$C_{18:2}$	2,18
Oleato de metila	cis-9-octadecenoato de metila	23,858	$C_{18:1}$	10,67
Elaidato de metila	trans-9-octadecenoato de metila	23,973	$C_{18:1}$	4,66
Estearato de metila	Octadecanoato de metila	24,365	$C_{18:0}$	6,84
Araquidonato de metila	Cis,cis,cis,cis-5,8,11,14-eicosatetraenoato de metila	27,107	$C_{20:4}$	0,67

DHA metila	de	Cis,cis,cis,cis,cis,cis-4,7,10,13,16,19-docosa-hexaenoato de metila	27,257	C <sub>22:6</sub>	0,63
Homogama linolenato de metila	de	Cis,cis,cis-8,11,14-eicosatrienoato de metila	27,444	C <sub>20:3</sub>	1,22
-		Cis,cis-11,14-eicosadienoato de metila	27,799	C <sub>20:2</sub>	1,43
-		cis-11-eicosenoato de metila	27,882	C <sub>20:1</sub>	2,77
-		cis-11,14,17-eicosatrienoato de metila	27,949	C <sub>20:3</sub>	1,68
Araquidato de metila		Eicosanoato de metila	28,383	C <sub>20:0</sub>	6,40
-		Heneicosanoato de metila	30,330	C <sub>21:0</sub>	1,76
-		Cis,cis-13,16-docosadienoato de metila	31,761	C <sub>22:2</sub>	2,36
Behenato de metila	de	Docosanoato de metila	32,227	C <sub>22:0</sub>	4,44
-		Tricosanoato de metila	34,140	C <sub>23:0</sub>	0,39
Lignocerato de metila		Tetracosanoato de metila	35,925	C <sub>24:0</sub>	0,77

nC = número de carbonos; nl = número de insaturações presentes na molécula.

Os ésteres presentes nas AME foram identificados por dois parâmetros: 1) comparação dos tempos de retenção do padrão de FAME, e 2) comparação dos espectros de massas dos ésteres das AME com os espectros de massas da espectroteca do NIST 05. A Figura 11 ilustra o TICC das AME.

**Figura 11** – Cromatogramas das correntes totais de íons (TICC) das amostras de misturas de ésteres analisadas por GC/MS.



Observando o TICC da Figura 11, nota-se que os ésteres majoritários em cada amostra, C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:2</sub>, C<sub>18:1</sub>, C<sub>18:0</sub>, são semelhantes entre si. Os ésteres minoritários variaram entre as amostras e esta diferença está relacionada ao tipo de matéria-prima utilizada para produção da mistura de ésteres. Na Tabela 11 estão apresentadas as áreas relativas de cada éster identificado nas AME por GC/MS.

**Tabela 11** – Área relativa dos ésteres presentes nas amostras de misturas de ésteres identificados por GC/MS.

Área relativa dos ésteres (%)						
Nome trivial	Esqueleto C <sub>n</sub> C:nl	Amostra				
		OF	EE	GCG	OFE	OSA
Ácido Láurico	C <sub>12:0</sub>	-	0,10	0,30	-	-
Ácido Mirístico	C <sub>14:0</sub>	-	2,20	1,52	-	0,12
Ácido Pentadecanóico	C <sub>15:0</sub>	-	0,12	0,11	-	-
Ácido Palmitoleico	C <sub>16:1</sub>	0,04	0,08	0,40	-	0,18
Ácido Palmítico	C <sub>16:0</sub>	11,28	23,00	29,53	0,50	18,56
Ácido hexadecanóico-14 metil	C <sub>17:0</sub> RAM	-	-	0,08	-	-
Ácido Hexadecanóico-15 metil	C <sub>17:0</sub> RAM	-	-	0,19	-	-
Ácido Heptadecanóico	C <sub>17:0</sub>	0,04	0,21	0,29	-	-
Ácido Linoleico	C <sub>18:2</sub>	34,35	-	12,68	1,56	50,47
Ácido Oleico	C <sub>18:1</sub>	35,22	6,98	44,17	1,50	27,05
Ácido Estéarico	C <sub>18:0</sub>	5,23	5,63	10,72	0,21	3,46
Ácido Estéarico-epoxidado	C <sub>18:0</sub>	0,35	-	-	-	-
Ácido Araquídico	C <sub>20:0</sub>	0,23	0,15	0,09	-	0,16
Ácido Behênico	C <sub>22:0</sub>	0,21	0,15	-	-	-
Ácido Láurico	*C <sub>12:0</sub>	-	0,29	-	-	-
Ácido Mirístico	*C <sub>14:0</sub>	3,19	3,19	-	-	-
Ácido tetradecanóico-14 metil	*C <sub>15:0</sub>	0,07	0,07	-	-	-
Ácido Pentadecanóico	*C <sub>15:0</sub>	0,18	0,18	-	-	-
Ácido Palmitoleico	*C <sub>16:1</sub>	-	0,30	-	0,12	-
Ácido Palmítico	*C <sub>16:0</sub>	1,93	33,83	-	11,77	-
Ácido hexadecanóico-14 metil	*C <sub>17:0</sub> RAM	-	0,08	-	-	-
Ácido Hexadecanóico-15 metil	*C <sub>17:0</sub> RAM	-	0,18	-	-	-
Ácido Heptadecanóico	*C <sub>17:0</sub>	-	0,20	-	-	-
Ácido Linoleico	*C <sub>18:2</sub>	5,52	-	-	44,39	-
Ácido Oleico	*C <sub>18:1</sub>	4,82	12,51	-	35,67	-
Ácido Estéarico	*C <sub>18:0</sub>	0,72	9,62	-	4,14	-
Ácido Estéarico-epoxidado	*C <sub>18:0</sub>	0,59	-	-	-	-
Ácido Araquídico	*C <sub>20:0</sub>	-	0,14	-	0,06	-
Compostos não identificados	-	0,41	-	-	0,08	-

\*ésteres etílicos; nC = número de carbonos na cadeia linear; nl = número de insaturações; RAM = ramificado.

Observando o TICC da Figura 11, nota-se que na amostra OF os picos do ácido linoleico ( $C_{18:2}$ ) e do oleico ( $C_{18:1}$ ) metílico, nos tempos de retenção de 23,740 e 23,973 min, apresentaram uma intensidade consideravelmente menor que os picos do ácido linoleico e do oleico etílico, nos tempo de retenção de 25,109 e 25,263 min, da amostra OFE.

A intensidade do pico é influenciada pelo fator de resposta do detector ao analito e da concentração do analito na amostra. Assim, a altura do pico é proporcional a área que está relacionada com a quantidade do composto presente na amostra. Ambas as amostras, OF e OFE, são derivadas da mesma matéria-prima, logo, os picos desses compostos deveriam apresentar intensidades próximas, mas isto não aconteceu. Esta observação pode ser justificada pelo fato da amostra OF apresentar um teor de ésteres menor que a OFE. Vale ressaltar que o pico do  $C_{16:0}$  dessas amostras não apresentou diferenças de intensidades como acontece no  $C_{18:2}$  e  $C_{18:1}$ . No caso dos ésteres saturados, a degradação acontece principalmente por hidrólise, conquanto, nos ésteres insaturados a degradação pode ocorrer por hidrólise e por oxidação. A oxidação é fortemente influenciada pelo número de insaturações que o ácido possui. Assim, o ácido linoleico é mais propício a oxidação que o ácido oleico [70].

Dignac *et al.*, (2000) [84], ao analisarem os principais ácidos graxos que compõem os triacilgliceróis (TAG) presentes em águas residuais da estação de tratamento de esgoto (ETE) da cidade de Compiègne na França, identificaram a presença dos ácidos graxos  $C_{15:0}$  e  $C_{17:0}$ , que normalmente são oriundos de bactérias. De igual modo, segundo os autores, os ácidos graxos  $C_{15:1}$  e  $C_{17:1}$  também são provenientes de bactérias, porém, estes não foram reportados em seu trabalho.

Collard, Teychené e Lemée (2015) [111] identificaram no biodiesel produzido a partir do lodo do esgoto da ETE da cidade de Poitiers a presença dos ácidos graxos  $C_{15:0}$  e  $C_{17:0}$  nas formas linear, iso e anteiso para ambos os ésteres, que segundo os autores denota atividade bacteriana.

Na Tabela 11 foi observado a presença de ésteres etílicos nas amostras OF e EE obtidas pelo processo de transesterificação metílica catalisada por base. De igual modo, foi observado a presença de ésteres metílicos na amostra OFE obtida pelo processo de transesterificação etílica catalisada por base. Em

contato com a empresa responsável pelo processo de produção, foi levantado duas hipóteses para justificar o fato: 1) contaminação cruzada entre os processos de produção das amostras (OF, EE e OFE) dentro do reator, 2) contaminação do álcool utilizado. Todavia, a empresa não soube dizer ao certo qual o motivo para justificar o fato.

Na Tabela 11, os ácidos graxos  $C_{15:0}$  e  $C_{17:0}$  ramificado só foi identificado nas amostras EE e GCG, as quais são derivadas da gordura da caixa de gordura e espuma de esgoto, essas matérias-primas são propícias à proliferação de microorganismos e à atividade microbiológica. Assim, estes ésteres podem ser derivados de microorganismos. O  $C_{17:0}$  linear foi identificado nas amostras OF, EE e GCG. Esse ácido graxo está presente em gorduras animais [112]. Assim, para amostra OF o  $C_{17:0}$  pode ser aderido ao óleo residual pelo processo de fritura de alimentos de animais; na amostra EE e GCG, esse ácido graxo pode ser oriundo de microorganismos e do descarte do óleo residual diretamente nas tubulações do sistema de esgoto domiciliar, que, por sua vez é despejado nas ETE. Na amostra OSA não foi identificado nenhum dos ácidos graxos citados nesse parágrafo, pois óleos vegetais apresentam normalmente ácidos graxos lineares e pares.

#### **4.3 Teor de compostos polares totais (CPT) determinados em amostras de misturas de ésteres pelo método cromatografia em coluna aberta (CC)**

A presença e a composição química de compostos polares em óleos e gorduras animais, após o processo de fritura é variável. Essa variação corresponde a composição química e ao percentual total de compostos polares na amostra. As percentagens de compostos polares variam de 3 a 30% (m/m), e valores inferiores correspondem aos óleos virgens ou refinados [113].

Há três décadas, o método de cromatografia em coluna aberta para determinação de compostos polares totais tem sido utilizado para avaliar a qualidade de óleos e gorduras, tornando-se o método padrão publicado e indicado pela IUPAC [106]. Esse método avalia o grau de degradação dos óleos e apresenta algumas vantagens, tais como: i) fornece a medida direta da



deterioração do óleo seja pelo processo oxidativo, por hidrólise ou pelo processo térmico e ii) pode ser utilizado para qualquer tipo de amostras. Na Tabela 12 estão ilustrados os percentuais dos CPT nas amostras analisadas.

**Tabela 12** – Tratamento das amostras de misturas de ésteres por cromatografia em coluna aberta com sílica desativada a 5% de água (m/m) pelo método publicado da IUPAC 2-507 [106].

Amostras	%Percentagem das frações (m/m)		
	Fração apolar (Hex/Et <sub>2</sub> O)	CPT teórico	Fração polar
			CPT experimental (Et <sub>2</sub> O/ACN)
OF	77,61	22,39	14,84
EE	76,65	23,35	10,45
GCG	86,52	13,48	7,30
OFE	96,33	3,67	2,88
OSA	87,43	12,57	10,09

Hex = *n*-hexano; Et<sub>2</sub>O = éter etílico; ACN = acetonitrila.

ISSARIYAKUL *et al.*, (2007) [114], em uma amostra de óleo residual proveniente de restaurante, determinaram um teor de CPT de 22%, que é considerado como um alto grau de deterioração do óleo. Segundo os autores, além de água e ácidos graxos livres, a amostra estava contaminada com outros produtos químicos, devido à exposição do óleo ao oxigênio atmosférico e a alta temperatura durante o processo de fritura dos alimentos.

A fração Hex/Et<sub>2</sub>O representa o teor de ésteres das amostras, e com base na massa eluída nesta fração, obtêm-se o percentual de CPT. Conforme ilustra a Tabela 12, é notado que as amostras OF, EE e GCG apresentam maior percentual de deterioração. As amostras OF e EE apresentaram um teor de CPT de 22,39% e 23,35%, respectivamente, o que indicou um grau de degradação igual a um óleo após o processo de fritura [114]. Por GC-FID, as amostras EE e GCG apresentaram teores de ésteres menores que as demais.

Analizando os resultados do CPT experimental com o teórico, nas amostras OF e EE, foi observado uma quantidade maior de compostos (contaminantes) retidos no adsorvente (SiO<sub>2</sub>) quando comparado com as

demais amostras. Nesse caso, as interações entre as ligações dos contaminantes com a  $\text{SiO}_2$  foram mais fortes que as interações dos contaminantes com o solvente de eluição utilizado neles. Ligações de hidrogênio entre compostos são consideradas como forte. Assim, os compostos que ficaram retidos no adsorvente após a passagem do solvente de eluição podem apresentar grupos hidroxilas que irão interagir através de ligações de hidrogênio com os grupos silanóis da sílica, o que dificulta a eluição deles.

Foi comparado o teor de ésteres (fração apolar) obtido entre o método de cromatografia em coluna aberta e da metodologia NBR 15764:2009, que utiliza a técnica de GC-FID para realizar a determinação do teor de ésteres. A Tabela 13 mostra o teor de ésteres obtido pelos dois métodos.

**Tabela 13** – Comparação do teor de ésteres das amostras de misturas de ésteres obtidos pelo método de GC-FID e pelo método de cromatografia em coluna aberta.

Amostras	%Percentual de ésteres (m/m)	
	GC-FID	CC
OF	78,82	77,61
EE	70,38	76,65
GCG	73,58	86,52
OFE	90,80	96,33
OSA	86,73	87,43

A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), através da Resolução de nº 45 de agosto de 2014, estabeleceu o método de GC-FID como a metodologia oficial para determinação do teor de ésteres em amostras de biodiesel [63]. O método da IUPAC 2-507 [106] é proposto para determinação do percentual (m/m) de compostos polares totais (CPT) em amostras de óleos vegetais, que por sua vez indica o percentual (m/m) de deterioração do óleo. Como os triacilgliceróis e os ésteres apresentam propriedades químicas semelhantes, eles sofrem as mesmas reações, logo o método indicado pela IUPAC 2-507 também pode ser aplicado para se ter uma

estimativa do percentual (m/m) de ésteres e do percentual (m/m) de CPT em amostras de misturas de ésteres (AME).

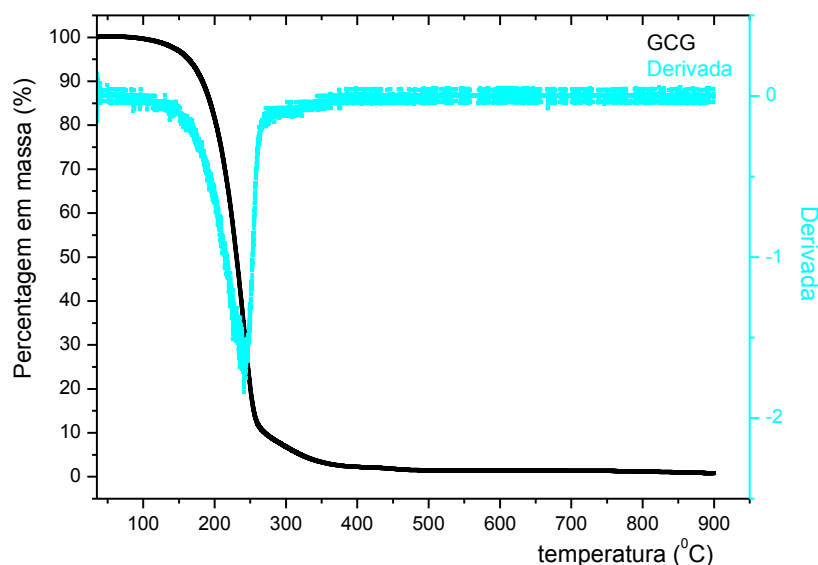
Na Tabela 13, é notável que os teores de ésteres para as amostras OF e OSA, utilizando a técnica de GC-FID e a técnica de CC se equivalem para os dois métodos, porém para as demais amostras os teores de ésteres nas duas técnicas não são próximos, o que denota a necessidade de otimizar o método de cromatografia em coluna aberta para que ele possa ser aplicado na determinação do teor de contaminantes em amostras de misturas de ésteres. O método de GC-FID é o método oficial para determinação do teor de ésteres assim estabelecido pelo ANP, logo, ele é mais preciso e confiável comparado ao método de CC.

O método de CC indicou o percentual (m/m) de CPT presente em amostras de misturas de ésteres, porém nada diz sobre a complexidade de classes orgânicas que fazem parte da composição química dos contaminantes. Para otimizar o método de cromatografia em coluna aberta que vise a determinação do percentual (m/m) de ésteres e do percentual (m/m) de contaminantes em amostras de misturas de ésteres, existe a necessidade do uso de técnicas mais avançadas que visem a caracterização estrutural das AME, que englobe os ésteres e os contaminantes. Com base na estrutura dos contaminantes, o método de CC poderá ser otimizado e utilizado para determinação do percentual (m/m) de ésteres e do percentual (m/m) de contaminantes em AME.

#### **4.4 Análise termogravimétrica utilizada na determinação do percentual (m/m) de ésteres e no percentual (m/m) de contaminantes em amostras de misturas de ésteres**

A análise termogravimétrica (TG) é uma técnica que avalia a perda de massa em função da temperatura pela volatilização ou degradação dos constituintes presentes na amostra [102]. Pela curva TG é possível acompanhar o grau de degradação da AME. Como exemplo da avaliação do perfil térmico, a Figura 12 ilustra a curva de TG e a derivada da curva TG (DTG) para amostra GCG.

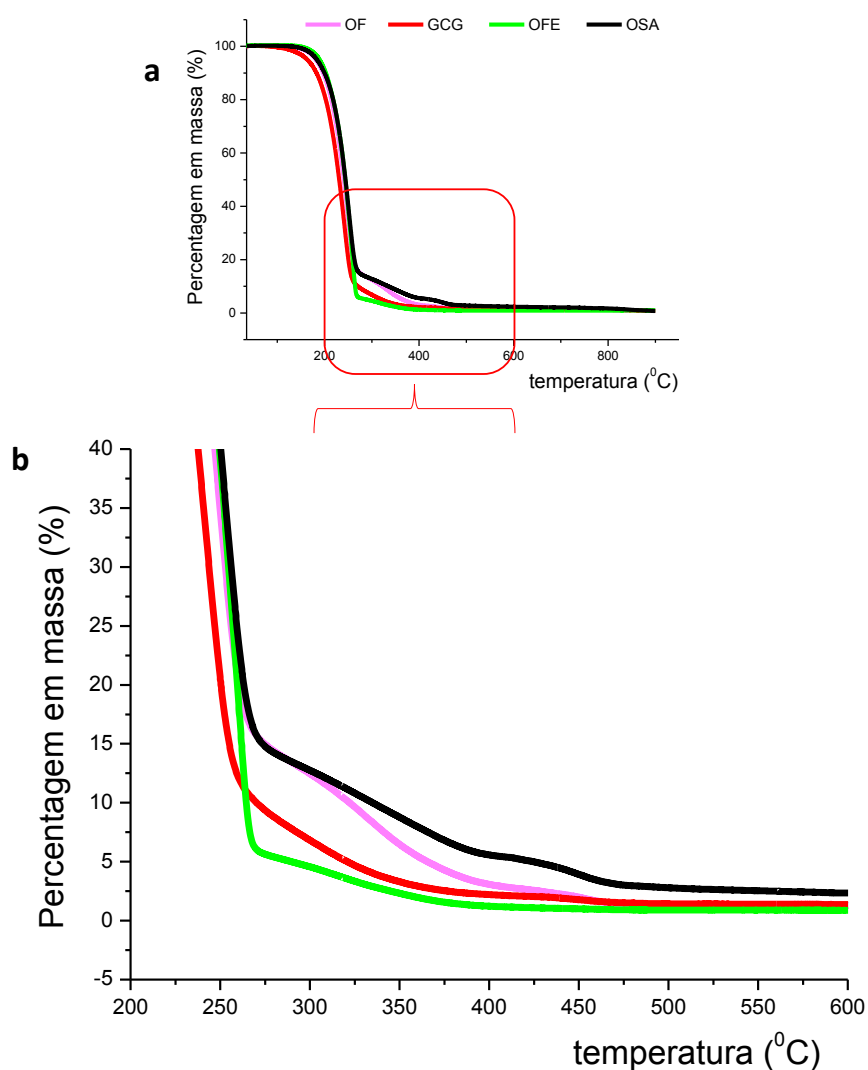
**Figura 12** – Curva termogravimétrica e a sua derivada (DTG) da amostra GCG.



Conforme a Figura 12, a perda de massa da amostra GCG aconteceu principalmente até 300 °C com um percentual de 93,09%. A curva DTG ajudou a determinar a temperatura em que existe a taxa máxima de massa perdida da amostra por volatilização ou decomposição térmica.

O pico máximo da curva DTG foi em torno de 247 °C para todas as amostras (OF, GCG e OSA) via transesterificação metílica e de 260 °C para amostra OFE via transesterificação etílica. Esta última apresentou um pico de temperatura maior devido ao aumento da cadeia dos ésteres quando é utilizado etanol para sua produção. A Figura 13 mostra as curvas TG das amostras de misturas de ésteres analisadas neste trabalho.

**Figura 13** – Curvas termogravimétricas das amostras de misturas de ésteres sobrepostas.



Zhão *et al.*, (2012) [99] analisaram o perfil térmico de três amostras de biodiesel derivadas de óleo de soja por transesterificação metílica com catálise básica, denominados B1 (sintetizado pelos autores), B2 (comercial), e B3 (sem identificação da matéria-prima e do processo de produção). As amostras tiveram os teores de ésteres determinados por GC-FID baseado na EN 14103, as amostras B1, B2 e B3 apresentaram teores de ésteres de 98,9; 98,9 e 64,40%, respectivamente. Foram observados nessas amostras que o pico da curva DTG com maior perda de massa foi em 225 °C. Até 300 °C foi determinado como a temperatura de volatilização ou decomposição dos

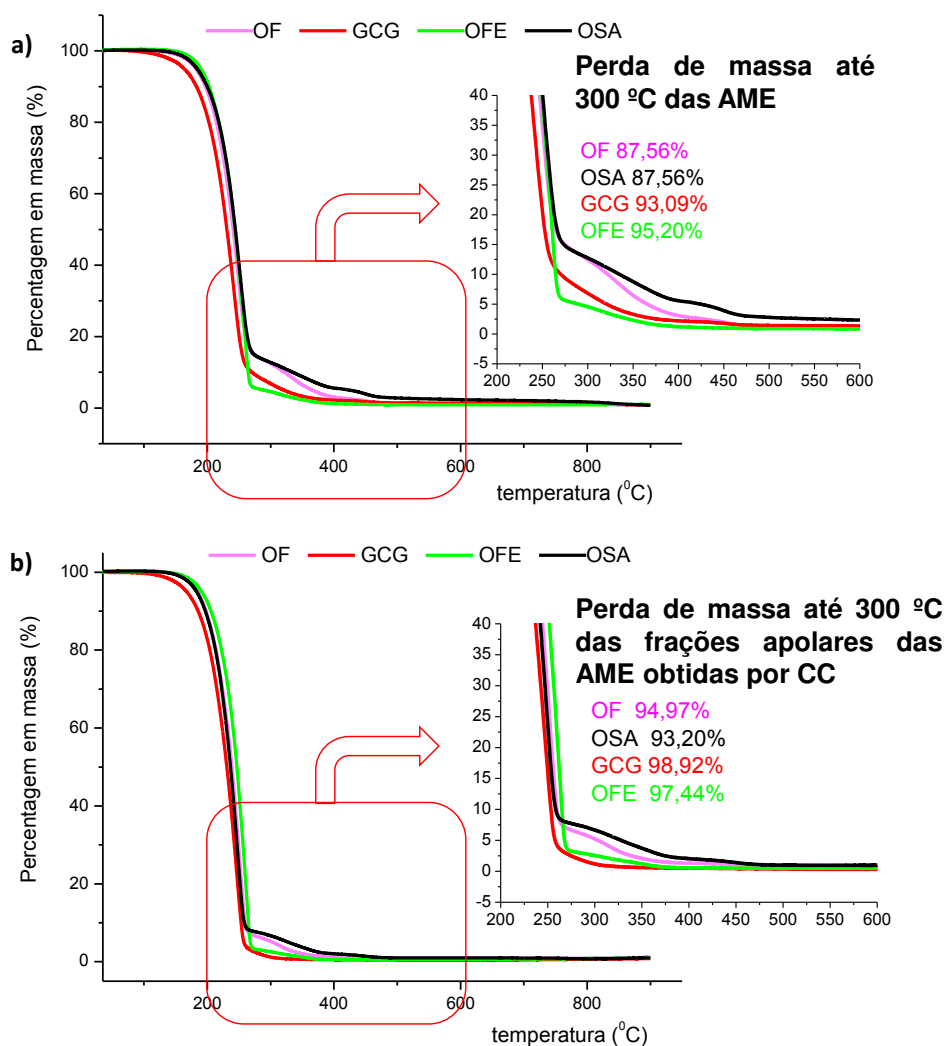
ésteres, em que as amostras B1 e B2 tiveram 99,9 e 99,8% de perda de massa e a B3 67,5%.

Vega-Lizama *et al.*, (2015) [102] analisaram o efeito da degradação de biodiesel de óleo de soja sob atmosfera de oxigênio e observaram que acima de 294 °C as perdas de massas devem ser atribuídas aos produtos de degradação do biodiesel por oxidação.

Conforme a Figura 13, pelas curvas TG das amostras analisadas neste trabalho, foi observado que na faixa da temperatura ambiente até 300 °C, as amostras OF, GCG, OFE e OSA apresentaram uma perda de massa de 87,56; 93,09; 95,20 e 87,56%, respectivamente. Em virtude da falta da amostra EE, a análise TG não foi realizada. Em uma análise minuciosa, essa faixa de temperatura não é um bom indicativo para determinar o teor de ésteres, pois glicerina residual, FFA, monoacilglicerol podem volatilizar ou se decompor nessa faixa de temperatura, o que pode levar a uma interpretação equivocada dos dados e do teor de ésteres [97]. Em contrapartida, a massa residual acima de 300 °C pode ser atribuída a presença de contaminantes, que podem ser diacilgliceróis, triacilgliceróis e dímeros formados pelo processo de degradação oxidativa, por exemplo.

As frações apolares das amostras de misturas de ésteres obtidas por cromatografia em coluna aberta tiveram seus perfis térmicos avaliados e comparados com os perfis térmicos das amostras brutas conforme ilustra a Figura 14.

**Figura 14** – Perfis térmicos **a)** amostras brutas de misturas de ésteres **b)** fração apolar obtida pelo processo de cromatografia em coluna aberta.



Com base nos dados da Figura 14, foram determinados os picos máximos de temperatura extraídos da DTG em que ocorre a maior perda de massa, que foram iguais para as AME brutas e para frações apolares das AME obtidas por cromatografia em coluna aberta. Vale ressaltar que a curva de decaimento de massa da fração apolar da amostra GCG após a CC ficou mais próxima do decaimento de massa das outras amostras. A amostra GCG apresentou um teor baixo de ésteres (73,58%) determinado por GC-FID quando comparado pelo teor de ésteres obtido por CC (86,52%), sendo que os contaminantes podem ser FFA gerados pela degradação hidrolítica dos ésteres

e/ou FFA de cadeias menores formados pelo processo de degradação oxidativa, em que esses contaminantes foram totalmente ou parcialmente removidos pelo método de CC. Para confirmar esta hipótese os índices de acidez dessas amostras foram determinados e serão apresentados no item 4.6.

A ANP exige um teor de ésteres mínimo de 96,5% (m/m), e é notável que as amostras OF e OSA na temperatura de 300 °C não chegaram a perda de massa de 96,5%, ou seja, o processo de CC ainda precisa de ajustes, pois alguns contaminantes ainda coeluem com a fração apolar que contém os ésteres.

#### **4.5 Aplicação da ionização ambiente por *sonic-spray* (EASI-MS) na caracterização das amostras de misturas de ésteres**

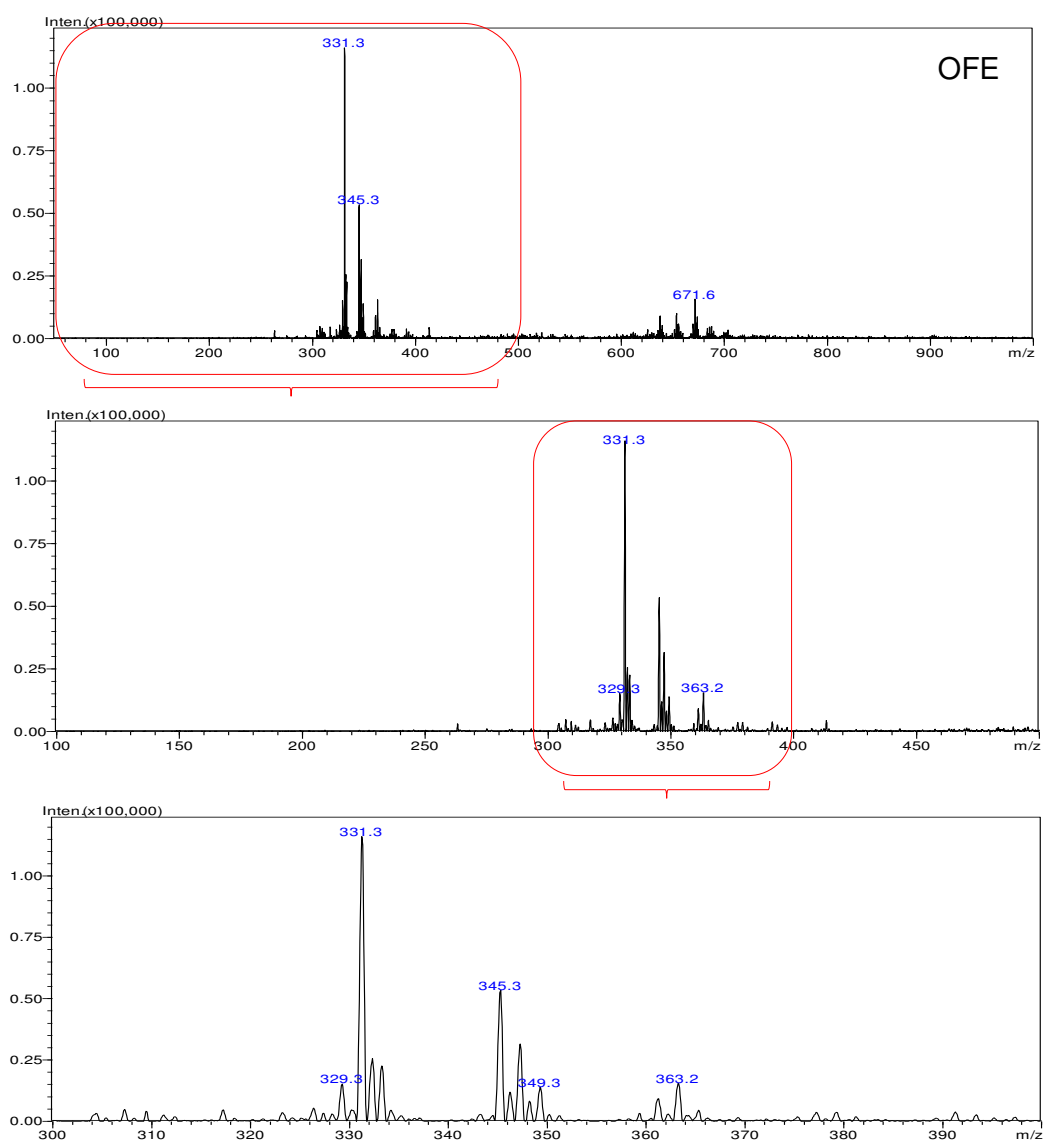
##### *4.5.1 Caracterização da composição química das amostras de misturas de ésteres por EASI(+)-MS*

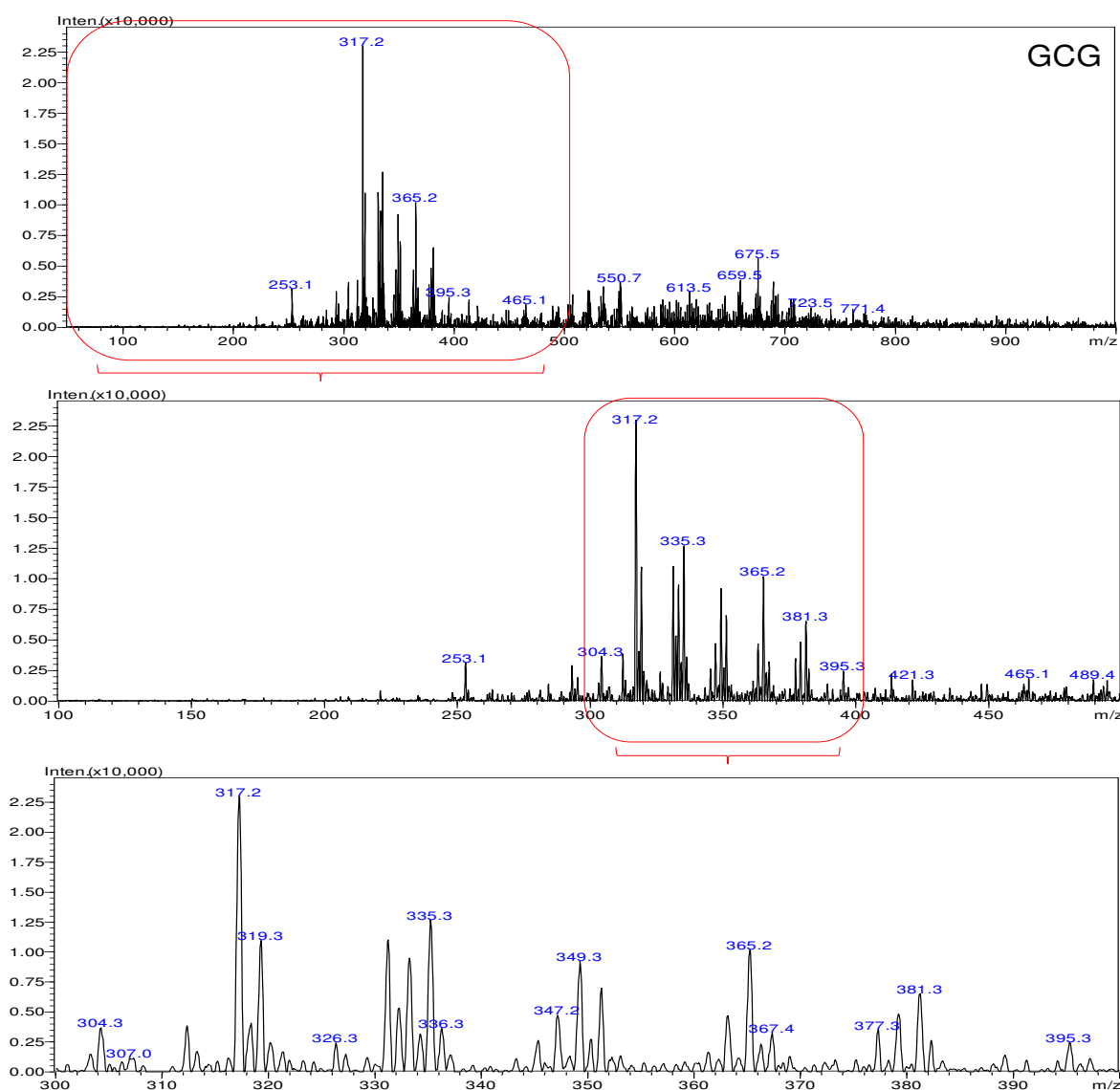
###### *4.5.1.1 Caracterização dos ésteres presentes nas amostras de misturas de ésteres*

Os íons de analitos predominantemente formados na análise dos ésteres por EASI(+) são  $[M + Na]^+$  e  $[M + K]^+$ . Esses íons ou aductos são conhecidos por formar espécies gasosas de alta resistência à dissociação. Assim, no espectro do EASI-MS um íon detectado é um composto ionizado, ou seja, não ocorre a fragmentação da molécula como ocorre na ionização por elétrons na análise por GC/MS. No metanol (grau HPLC) utilizado como solvente na análise por EASI, a concentração dos íons  $Na^+$  e  $K^+$  é muito baixa. Logo, esses cátions estão presentes nas amostras como resíduo do processo de transesterificação utilizado na produção do biodiesel [115]. Como exemplo, a Figura 15 e a Figura 16 mostram os espectros de massas obtidos por EASI(+)-MS das amostras OFE e GCG que tiveram a região do espectro de massas na faixa de  $m/z$  300 a 400 ampliadas para visualizar melhor os íons característicos dos ésteres detectados.



**Figura 15** – Espectro de massas da amostra OFE obtido por EASI(+)-MS.



**Figura 16** – Espectro de massas da amostra GCG obtido por EASI(+)-MS.

Observando os espectros da Figura 15 e da Figura 16, nota-se que o espectro da amostra OFE é muito mais limpo do que a amostra GCG em toda a faixa de massas. Esse perfil da quantidade de compostos detectados está diretamente ligado ao teor de ésteres. A amostra OFE apresentou um teor de ésteres de 90,80% e a amostra GCG 73,58% (m/m), por conseguinte além dos ésteres é esperado que a amostra com menor percentual de ésteres apresente maior número de compostos detectados. Esse comportamento foi observado para todas as amostras de misturas de ésteres. Os espectros do EASI(+)-MS das demais AME estão no Apêndice. A Tabela 14 mostra os ésteres detectados por EASI(+)-MS para todas as amostras.

**Tabela 14** – Identificação dos ésteres presentes nas amostras de misturas de ésteres por EASI(+)-MS.

Ésteres das amostras de biodiesel identificados							
Composição do ácido graxo	[FAME + Na] <sup>+</sup>	[FAME + K] <sup>+</sup>	Amostra				
			OF	EE	GCG	OFE	OSA
C <sub>12:0</sub>	237	253	nd	<sup>2</sup> X	<sup>2</sup> X	nd	nd
C <sub>14:0</sub>	265	281	nd	<sup>2</sup> X	nd	nd	nd
C <sub>16:0</sub>	293	309	<sup>1</sup> X	<sup>1</sup> X	<sup>1</sup> X	nd	nd
C <sub>18:3</sub>	315	331	<sup>3</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>3</sup> X
C <sub>18:2</sub>	317	333	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>3</sup> X
C <sub>18:1</sub>	319	335	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:0</sub>	321	337	nd	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	nd
*C <sub>16:0</sub>	307	323	nd	<sup>3</sup> X	nd	nd	nd
*C <sub>18:3</sub>	329	345	<sup>3</sup> X	<sup>2</sup> X	nd	<sup>3</sup> X	nd
*C <sub>18:2</sub>	331	347	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X	nd
*C <sub>18:1</sub>	333	349	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X	nd
*C <sub>18:0</sub>	335	351	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X

\* = ésteres etílicos; <sup>1</sup>X = ácido graxo detectado na forma sodiada; <sup>2</sup>X = ácido graxo detectado na forma potassiada; <sup>3</sup>X = ácido graxo detectado nas formas sodiada e potassiada; nd = não detectado.

Fernandes *et al.*, (2014) [116] observaram que a eficiência da ionização por EASI é influenciada pelo nível de insaturação presente nos ésteres. No estudo, os autores chegaram à conclusão que a eficiência de ionização varia do C<sub>18:0</sub> ao C<sub>18:1</sub> (aumento de sete vezes) e do C<sub>18:1</sub> ao C<sub>18:2</sub> (aumento nove vezes), do C<sub>18:2</sub> ao C<sub>18:3</sub> a eficiência de ionização começou a estabilizar (um aumento aparente de apenas 1,5 vezes). Para a C<sub>16:0</sub> a eficiência de ionização é baixa, aproximadamente quinhentas vezes menor em relação ao C<sub>18:3</sub>.

Na Tabela 14, nota-se que o íon referente ao éster C<sub>16:0</sub> metílico na forma [M + Na]<sup>+</sup> de *m/z* 293 e de 307 para o éster etílico não foram detectados para as amostras OFE e OSA apesar de possuírem uma área relativa de 11,77 e 18,56% determinados pela análise no GC/MS (item 4.2), respectivamente. Essas amostras foram as que apresentaram maiores teores de ésteres, de 90,80% para OFE e 86,73% para a OSA. O C<sub>18:2</sub> é majoritário para essas amostras e ele apresenta alta facilidade de ionização por EASI. Uma vez que a ionização dos ésteres é diretamente influenciada pelo nível de insaturação, deve ter ocorrido o efeito de supressão iônica sobre o C<sub>16:0</sub> presente nas

amostras OFE e OSA [116]. De igual modo, o  $C_{18:0}$  metílico nas formas  $[M + Na]^+$  e  $[M + K]^+$  de  $m/z$  321 e 337 só foi detectado nas amostras EE e GCG pelo mesmo motivo que foi explicado para o  $C_{16:0}$ .

O  $C_{18:0}$  etílico nas formas  $[M + Na]^+$  e  $[M + K]^+$  de  $m/z$  335 e 351, respectivamente, foi detectado para todas as amostras, com exceção da amostras OFE. Porém, não se pode afirmar que esses íons são provenientes da ionização do  $C_{18:0}$  etílico na forma sodiada e potassiada, pois o íon de  $m/z$  335 também pode ser detectado para o éster  $C_{18:1}$  epoxidado na forma sodiada  $[C_{18:1} + O + Na]^+$  e como o  $C_{18:1}$  na forma potassiada  $[C_{18:1} + K]^+$ . De igual modo, o íon de  $m/z$  351 também pode ser detectado para o  $[C_{18:1} + 2O + Na]^+$  e  $[C_{18:1} + O + K]^+$  [117]. Esses íons detectados com oxigênio extra além dos oxigênios da função éster são considerados como produtos primários de oxidação da amostra (hidroperóxidos) decorrentes da degradação oxidativa. A correlação dos íons de  $m/z$  335 e 351 com esses hidroperóxidos pode ser confirmada na Tabela 15.

#### 4.5.1.2 Caracterização dos produtos de oxidação primário gerados nas amostras de misturas de ésteres

Da análise por GC/MS (item 4.2), os ácidos graxos insaturados majoritários nas amostras foram o ácido linoleico e o ácido oleico. O ácido linolênico não foi identificado por GC/MS, porém ele pode estar presente nas AME na forma de contaminante, como hidroperóxidos e/ou dímeros, por exemplo. Como esses ácidos graxos insaturados são majoritários, por conseguinte, os hidroperóxidos ou dímeros formados são provenientes deles. Esses hidroperóxidos são descritos como FAME(2O) ou FAEE(2O) e são detectados normalmente como  $[ÉSTER + 2O + Na]^+$  e  $[ÉSTER + 2O + K]^+$  [115]. A Tabela 15 mostra os hidroperóxidos identificados por EASI(+)-MS.

Tabela 15 – Contaminantes oriundos da oxidação das AME detectados no EASI(+)-MS.

Composição do ácido graxo	Éster (m/z)		OF - Produtos de oxidação							
			[Éster + O] (m/z)		[Éster + 2O] (m/z)		[Éster + 3O] (m/z)		[Éster + 4O] (m/z)	
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
C <sub>18:3</sub>	315	331	331	347	347	363	363	379	379	-
C <sub>18:2</sub>	317	333	333	349	349	365	365	381	381	-
C <sub>18:1</sub>	319	335	335	351	351	-	-	-	-	-
*C <sub>18:3</sub>	329	345	345	361	361	377	377	-	-	-
*C <sub>18:2</sub>	331	347	347	363	363	379	379	-	-	-
*C <sub>18:1</sub>	333	349	349	-	365	381	381	-	-	-
Composição do ácido graxo	Éster (m/z)		EE - Produtos de oxidação							
			[Éster + O] (m/z)		[Éster + 2O] (m/z)		[Éster + 3O] (m/z)		[Éster + 4O] (m/z)	
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
C <sub>18:3</sub>	-	331	331	347	347	363	363	379	379	395
C <sub>18:2</sub>	317	333	333	349	349	365	365	381	381	397
C <sub>18:1</sub>	319	335	335	351	351	367	367	-	-	-
*C <sub>18:3</sub>	-	345	345	361	361	377	377	393	393	-
*C <sub>18:2</sub>	331	347	347	363	363	379	379	395	395	411
*C <sub>18:1</sub>	333	349	349	365	365	381	381	397	397	-
Composição do ácido graxo	Éster (m/z)		GCG - Produtos de oxidação							
			[Éster + O] (m/z)		[Éster + 2O] (m/z)		[Éster + 3O] (m/z)		[Éster + 4O] (m/z)	
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
C <sub>18:3</sub>	-	331	331	347	347	363	363	379	379	395
C <sub>18:2</sub>	317	333	333	349	349	365	365	381	381	-
C <sub>18:1</sub>	319	335	335	351	351	367	367	-	-	-
Composição do ácido graxo	Éster (m/z)		OFE - Produtos de oxidação							
			[Éster + O] (m/z)		[Éster + 2O] (m/z)		[Éster + 3O] (m/z)		[Éster + 4O] (m/z)	
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
C <sub>18:3</sub>	-	331	331	347	347	363	363	-	-	-
C <sub>18:2</sub>	-	333	333	349	349	-	-	-	-	-
C <sub>18:1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*C <sub>18:3</sub>	329	345	345	361	361	-	-	-	-	-
*C <sub>18:2</sub>	331	347	347	363	363	-	-	-	-	-
*C <sub>18:1</sub>	333	349	349	-	-	-	-	-	-	-
Composição do ácido graxo	Éster (m/z)		OSA - Produtos de oxidação							
			[Éster + O] (m/z)		[Éster + 2O] (m/z)		[Éster + 3O] (m/z)		[Éster + 4O] (m/z)	
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
C <sub>18:3</sub>	315	331	331	347	347	363	363	379	379	-
C <sub>18:2</sub>	317	333	333	349	349	365	365	381	381	-
C <sub>18:1</sub>	319	335	335	351	351	-	-	-	-	-

\*Éster etílico

Conforme a Tabela 15, foi observado qualitativamente que as amostras OF, EE e GCG apresentaram maior quantidade de hidroperóxidos identificados. Essas amostras chegaram a um estado de oxidação primário com a formação de hidroperóxido e bishidroperóxido, ou seja, dois e quatro oxigênios a mais na molécula além dos oxigênios da função éster, os quais podem provocar uma diminuição no teor de ésteres. Vale ressaltar que as amostras OF, EE e GCG foram as que apresentaram menores teores de ésteres, o que justifica a presença dos contaminantes. Embora a amostra OSA tenha apresentado teor de ésteres de 8, 16 e 13% a mais que as amostras OF, EE e GCG, também foi identificado uma quantidade considerável de hidroperóxido e bishidroperóxido na amostra OSA. No entanto, é necessária uma análise do índice de peróxido, por exemplo, para que se possa confirmar se o decréscimo do teor de ésteres dessas amostras é decorrente majoritariamente desses contaminantes. A amostra OFE apresentou o maior teor de ésteres entre as amostras estudadas com 90,80%, por conseguinte ela apresentou uma quantidade de hidroperóxidos detectados menor que as demais amostras.

#### 4.5.1.3 Caracterização dos produtos de oxidação secundários gerados nas amostras de misturas de ésteres

Os hidroperóxidos são compostos susceptíveis a sofrerem degradação para formação de compostos de baixa ou alta massa molecular. A cisão homolítica da ligação RO-OH dos hidroperóxidos produz radical alcóxi, o qual pode reagir com outro radical alcóxi para produzir contaminantes de alta massa molecular (dímero), que podem precipitar e provocar problemas no sistema de ignição dos automóveis, ou, decompor-se pela clivagem da ligação carbono-carbono do radical alcóxi, gerando compostos de baixa massa molecular, tais como: aldeídos, hidrocarbonetos, etc [70].

A faixa de íons de  $m/z$  entre 600-700 detectada no EASI(+)-MS corresponde a presença de diacilgliceróis residuais da reação de transesterificação incompleta ou a dímeros nas formas de R-O-R e R-O-O-R formados pela degradação dos hidroperóxidos oriundos predominantemente

dos ácidos linolênico, linoleico e oleico. Após os dímeros serem formados, eles podem sofrer degradação oxidativa, produzindo novos hidroperóxidos [118,119]. Na Tabela 16 são mostrados os dímeros detectados nas amostras de misturas de ésteres.

**Tabela 16** – Dímeros e dímeros na forma de hidroperóxidos identificados nas amostras de misturas por EASI(+)-MS.

Principais dímeros e dímeros na forma de hidroperóxido e bishidroperóxido								
Dímeros	Massa Molecular (g mol <sup>-1</sup> )	[Dim + Na] <sup>+</sup> m/z	[Dim + K] <sup>+</sup> m/z	OF	EE	GCG	OFE	OSA
C <sub>18:3</sub> -O-C <sub>18:3</sub>	598	621	637	nd	<sup>3</sup> X	<sup>1</sup> X	<sup>2</sup> X	nd
C <sub>18:3</sub> -O-C <sub>18:2</sub>	600	623	639	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>2</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:3</sub> -O-C <sub>18:1</sub>	602	<sup>Δ</sup> 625	641	<sup>3</sup> X	<sup>1</sup> X	<sup>2</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:2</sub> -O-C <sub>18:2</sub>	602	<sup>Δ</sup> 625	641	<sup>3</sup> X	<sup>1</sup> X	<sup>2</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:2</sub> -O-C <sub>18:1</sub>	604	627	643	<sup>2</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>2</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:1</sub> -O-C <sub>18:1</sub>	606	629	645	<sup>2</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	nd
C <sub>18:3</sub> -O-O-C <sub>18:3</sub>	614	637	653	<sup>2</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X	nd
C <sub>18:3</sub> -O-O-C <sub>18:2</sub>	616	639	655	<sup>3</sup> X	<sup>1</sup> X	<sup>1</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>3</sup> X
C <sub>18:3</sub> -O-O-C <sub>18:1</sub>	618	641	657	<sup>3</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:2</sub> -O-O-C <sub>18:2</sub>	618	641	657	<sup>3</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:2</sub> -O-O-C <sub>18:1</sub>	620	643	659	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:1</sub> -O-O-C <sub>18:1</sub>	622	645	661	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>2</sup> X
C <sub>18:3</sub> -O-C <sub>18:3</sub> Hidroperóxido	630	653	669	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>1</sup> X	nd
C <sub>18:3</sub> -O-C <sub>18:3</sub> Bishidroperóxido	662	685	701	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>3</sup> X
C <sub>18:3</sub> -O-C <sub>18:2</sub> Hidroperóxido	632	655	671	<sup>3</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X
C <sub>18:3</sub> -O-C <sub>18:2</sub> Bishidroperóxido	664	687	703	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>1</sup> X
C <sub>18:3</sub> -O-C <sub>18:1</sub> Hidroperóxido	634	657	<sup>Δ</sup> 673	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>3</sup> X
C <sub>18:3</sub> -O-C <sub>18:1</sub> Bishidroperóxido	666	<sup>Δ</sup> 689	705	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X



C <sub>18:2</sub> -O-C <sub>18:2</sub> Hidroperóxido	634	657	<sup>Δ</sup> 673	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>2</sup> X	<sup>3</sup> X
C <sub>18:2</sub> -O-C <sub>18:2</sub> Bishidroperóxido	666	<sup>Δ</sup> 689	705	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:2</sub> -O-C <sub>18:1</sub> Hidroperóxido	636	659	675	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:2</sub> -O-C <sub>18:1</sub> Bishidroperóxido	668	691	707	<sup>1</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:1</sub> -O-C <sub>18:1</sub> Hidroperóxido	638	661	677	<sup>1</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>1</sup> X
C <sub>18:1</sub> -O-C <sub>18:1</sub> Bishidroperóxido	670	693	709	nd	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	nd
C <sub>18:3</sub> -O-O-C <sub>18:3</sub> Hidroperóxido	662	685	701	<sup>1</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	nd	<sup>1</sup> X
C <sub>18:3</sub> -O-O-C <sub>18:3</sub> Bishidroperóxido	694	717	733	nd	<sup>3</sup> X	nd	nd	nd
C <sub>18:3</sub> -O-O-C <sub>18:2</sub> Hidroperóxido	664	687	703	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>1</sup> X
C <sub>18:3</sub> -O-O-C <sub>18:2</sub> Bishidroperóxido	696	719	735	<sup>1</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	nd	nd
C <sub>18:3</sub> -O-O-C <sub>18:1</sub> Hidroperóxido	666	<sup>Δ</sup> 689	705	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:3</sub> -O-O-C <sub>18:1</sub> Bishidroperóxido	698	721	737	nd	<sup>3</sup> X	nd	nd	nd
C <sub>18:2</sub> -O-O-C <sub>18:2</sub> Hidroperóxido	666	<sup>Δ</sup> 689	705	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:2</sub> -O-O-C <sub>18:2</sub> Bishidroperóxido	698	721	737	nd	<sup>3</sup> X	nd	nd	nd
C <sub>18:2</sub> -O-O-C <sub>18:1</sub> Hidroperóxido	668	691	707	<sup>1</sup> X	<sup>3</sup> X	<sup>3</sup> X	nd	<sup>3</sup> X
C <sub>18:2</sub> -O-O-C <sub>18:1</sub> Bishidroperóxido	700	723	739	nd	nd	<sup>1</sup> X	nd	nd
C <sub>18:1</sub> -O-O-C <sub>18:1</sub> Hidroperóxido	670	693	709	nd	<sup>1</sup> X	<sup>1</sup> X	nd	nd
C <sub>18:1</sub> -O-O-C <sub>18:1</sub> Bishidroperóxido	702	725	741	nd	<sup>2</sup> X	<sup>2</sup> X	nd	nd

<sup>Δ</sup>lons = biomarcadores que confirmam a presença de dímeros formados pela degradação dos hidroperóxidos; <sup>1</sup>X = dímero detectado na forma sodiada; <sup>2</sup>X = dímero detectado na forma potassiada; <sup>3</sup>X = dímero detectado na forma sodiada e potassiada; nd = não detectado.

Apesar dessa faixa de *m/z* entre 600-700 ser atribuída a dímeros formados pela degradação dos hidroperóxidos e a presença de diacilgliceróis (DAG) residuais da reação de transesterificação incompleta, existem

biomarcadores que indicam a presença majoritária dos dímeros em relação aos diacilgliceróis, tais como os íons de  $m/z$  625, 673 e 689 [93]. Esses íons foram identificados nas amostras OF, EE, GCG e OSA. Como a amostra OFE é derivada da transesterificação etílica, os biomarcadores seriam os íons de  $m/z$  639, 687 e 703, no entanto, nenhum desses íons foram identificados para amostra OFE, assim não há evidência que a amostra OFE contenha alta contaminação por compostos de alta massa molecular.

Os dímeros identificados pelo EASI(+)-MS são mostrados na Tabela 16. Esses por sua vez, foram detectados nas formas de  $[\text{Dim} + \text{Na}]^+$  e  $[\text{Dim} + \text{K}]^+$  na seguinte ordem crescente das amostras EE>GCG>OF>OSA>OFE. Em contrapartida, com relação ao teor de ésteres, observa-se uma relação inversa aos dímeros, pois o maior teor de ésteres em ordem decrescente das amostras foram OFE>OSA>OF>GCG>EE. Logo, uma grande quantidade de dímeros detectados é um dos motivos para justificar o teor de ésteres das amostras de misturas de ésteres apresentados neste trabalho. Portanto, quanto maior a quantidade de dímeros detectados, menor será o teor de ésteres.

A faixa de íons de  $m/z$  entre 800-1000 é atribuída a presença de triacilgliceróis (TAG) que podem ser detectados nas formas de íons  $[\text{TAG} + \text{Na}]^+$  e  $[\text{TAG} + \text{K}]^+$ . Assim como os ésteres, os TAG podem sofrer degradação oxidativa e serem detectados na forma de hidroperóxido ou bishidroperóxido na análise por EASI(+)-MS. Nessa faixa de massas foram identificados apenas poucos íons de  $m/z$  901, 903, 933, 949, que foram atribuídos aos íons apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17** – Íons de  $m/z$  entre 800-1000 identificados nas amostras de misturas de ésteres por ESI(+)-MS.

Triacilgliceróis identificados na faixa de íons de 800 – 1000 $m/z$										
Composição do ácido graxo	TAG	[TAG + O]	[TAG + 2O] <sup>+</sup>		[TAG + 3O]	Amostra				
	$m/z$	$m/z$	$m/z$		$m/z$					
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	OF	EE	GCG	OFE	OSA
LLL ou OLLn	901	933	933	-	-	nd	nd	nd	nd	X
	-	-	-	949	949	X	nd	nd	nd	nd
OLL ou OOLn	903	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd	X

Ln = linolênico (C18:3); L = linoleico (C18:2); O = oleico (C18:1); X = detectado e nd = não detectado.

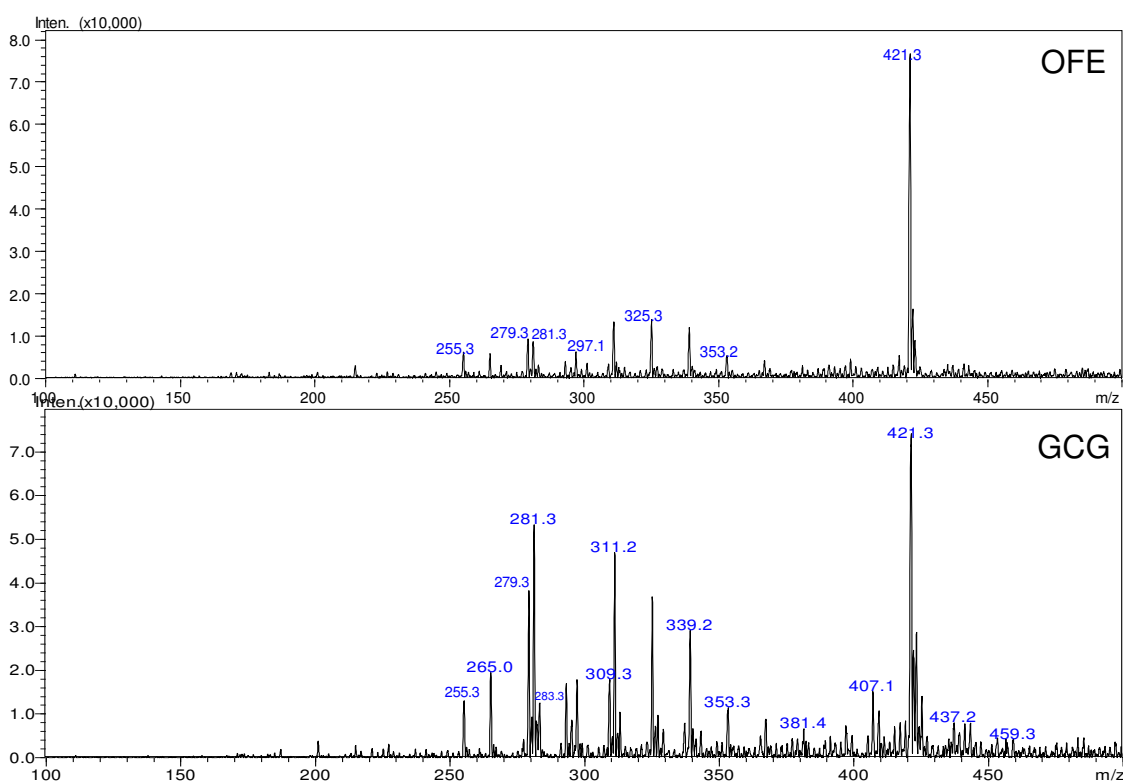
Na Tabela 17 foi notado a presença de TAG não oxidado e oxidado predominantemente na amostra OSA seguida da amostra OF. Para as demais amostras não foi identificado a presença de íon na faixa de  $m/z$  800-1000. Assim, as impurezas presentes nas amostras EE, GCG e OFE não são decorrentes da presença de TAG não oxidado e oxidado.

Os dados da curva termogravimétrica mostrou que em 300 °C as amostras OF, OSA, GCG, OFE apresentaram perdas de massas de 87,56; 87,56; 93,09 e 95,20%, respectivamente. Acima de 300 °C as perdas de massa é decorrente de compostos de alta massa molecular. Esses percentuais de perda de massas em 300 °C denotaram que as amostras OF e OSA apresentaram um percentual maior de compostos de alta massa molecular em sua composição, que podem ser oriundos da degradação oxidativa (dímeros) ou a presença de resíduos de DAG e de TAG residuais do processo de transesterificação incompleto. Dentre as amostras estudadas, a OSA apresentou maior percentual de contaminação por compostos de alta massa molecular, pois somente a 500 °C houve perda de 97,5% de massa para amostras OSA, que pode ser decorrente da presença de TAG e/ou da condensação de moléculas de TAG oriundas do processo de degradação oxidativa. Nessa temperatura ocorre a perda de massa devido a degradação decorrente do processo de pirólise. Em contrapartida, na temperatura de 415 °C a amostra OF já havia perdido 97,5% de massa.

#### 4.5.2 Caracterização da composição química das amostras de misturas de ésteres por EASI(-)-MS

A aplicação do EASI(-)-MS nas amostras de misturas de ésteres fornece um espectro de massas capaz de identificar os ácidos graxos livres (FFA) ou compostos fenólicos pela abstração dos hidrogênios ácidos desses compostos. Cada íon detectado é considerado como um composto na ionização por EASI(-)-MS, identificado na forma de  $[M - H]^-$  [120]. A Figura 17 mostra como exemplo os espectros de massas das amostras OFE e GCG obtidos pelo EASI(-)-MS.

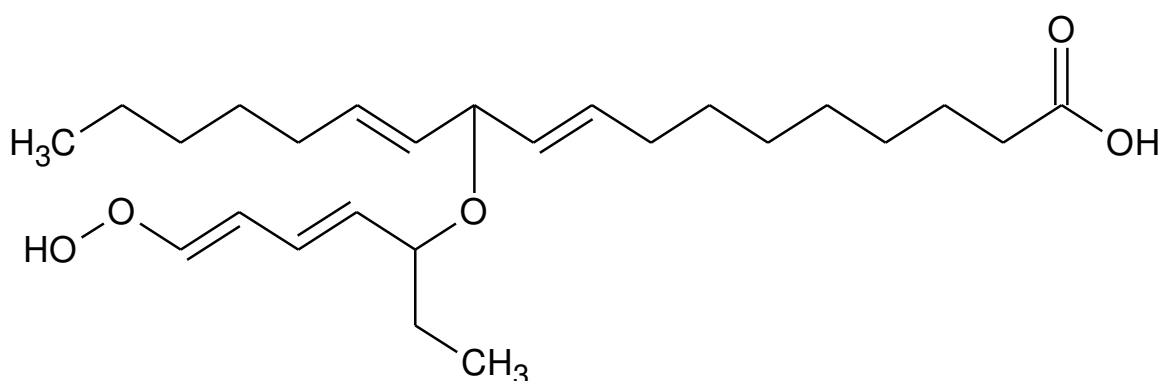
**Figura 17** – Espectro de massas das amostras OFE e GCG obtidos pelo EASI(-)-MS.



Nos espectros de massas apresentados na Figura 17, é nítido o íon de  $m/z$  421 como o pico base nas amostras OFE e GCG exemplificadas e nas demais amostras analisadas neste trabalho. Santos *et al.*, (2016) [92] atribuíram a presença desse íon ao FFA octacosenoico ( $C_{28:1}$ ) em nove amostras de óleos analisados por EASI(-)-MS, porém, não é comum encontrar

na literatura relato da presença desse FFA em amostras de óleos e gorduras. Pereira *et al.*, (2014) [93] identificaram dímeros formados pela condensação de partes da estrutura do ácido linoleico oriundas da degradação oxidativa. Assim, a estrutura do íon de  $m/z$  421 proposta neste trabalho foi atribuída a um dímero formado pela condensação de uma parte da estrutura do ácido linoleico livre com uma estrutura completa do ácido linoleico livre, conforme mostra a Figura 18.

**Figura 18** – Estrutura proposta para o íon de  $m/z$  421 identificado pelo EASI(-)-MS



Vale ressaltar que também foram identificados íons de  $m/z$  423 e 425 em todas as amostras. Esses íons podem ser o mesmo composto apresentado na Figura 18 com uma insaturação a menos para o íon de  $m/z$  423 e duas insaturações a menos para o íon de  $m/z$  425.

Nos espectros de massas representados na Figura 17, nota-se o conjunto de íons com  $m/z$  255, 279, 281 e 283 que são referentes aos ácidos graxos livres palmítico ( $C_{16:0}$ ), linoleico ( $C_{18:2}$ ), oleico ( $C_{18:1}$ ) e esteárico ( $C_{18:0}$ ), respectivamente. Esses íons estão presentes nos dois espectros mostrados com exceção do esteárico que não aparece para amostra OFE. Os ácidos graxos livres identificados no EASI(-)-MS para todas as amostras são mostrados na Tabela 18.

No espectro de massas da amostra GCG é notório a presença abundante do íon de  $m/z$  311, que por sua vez, foi identificado para todas as amostras analisadas. Esse íon pode ser atribuído ao ácido graxo livre

eicosanóico ( $C_{20:0}$ ), ou ao ácido graxo livre linoleico na forma de hidroperóxido  $[M + 2O - H]^-$ . Na literatura não é encontrado um alto percentual do  $C_{20:0}$  em amostras de óleos e gorduras, assim, a maior contribuição do íon de  $m/z$  311 na amostra GCG pode ser proveniente da ionização do ácido linoleico na forma de hidroperóxido.

**Tabela 18** – Ácidos graxos livres identificados nas amostras de misturas de ésteres pelo EASI(-)MS.

Ácidos graxos livres identificados nas amostras de biodiesel						
Esqueleto	$[M - H]^-$ ( $m/z$ )	OF	EE	GCG	OFE	OSA
$C_{15:0}$	241	nd	X	nd	nd	nd
$C_{16:0}$	255	X	X	X	X	X
$C_{17:0}$	269	nd	X	nd	nd	nd
$C_{18:2}$	279	X	nd	X	X	X
$C_{18:1}$	281	X	X	X	X	X
$C_{18:0}$	283	nd	X	X	nd	nd
$C_{20:1}$	309	X	X	X	nd	X
$C_{20:0}$	311	X	X	X	X	X
$C_{22:6}$	327	X	X	X	nd	nd
$C_{22:5}$	329	X	nd	X	nd	nd
$C_{22:1}$	337	X	X	X	nd	X
$C_{22:0}$	339	X	X	X	X	X
$C_{23:0}$	353	X	X	X	X	X
$C_{24:1}$	365	nd	nd	X	nd	nd
$C_{24:0}$	367	nd	X	X	X	nd
$C_{25:0}$	381	X	X	X	nd	nd
Composto da Figura 18	421	X	X	X	X	X

X = detectado; nd = não detectado.

Para confirmar a presença e estabelecer uma relação da contaminação nas amostras de misturas de ésteres por ácidos graxos livres e pelos hidroperóxidos, foram determinados os índices de acidez e os índices de

peróxidos das amostras iniciais. Além disso, com o intuito de identificar os FFA e os hidroperóxidos, as amostras foram derivatizadas com BSTFA e analisadas por GC/MS.

#### 4.6 Determinação do índice de acidez nas amostras de misturas de ésteres

O índice de acidez é um dos parâmetros de qualidade estabelecido pela ANP, na qual estabelece um limite máximo de 0,5 mg de KOH g<sup>-1</sup> de amostra de biodiesel. Um alto índice de acidez ocasiona problemas de corrosão no motor e nos tanques de estocagem com deposição de sedimentos [73,77]. A Tabela 19 mostra os índices de acidez determinados nas AME.

**Tabela 19** – Índices de acidez determinados nas amostras de misturas de ésteres.

Amostras	Índice de acidez (mg KOH g <sup>-1</sup> )*	Desvio padrão (s)
OF	4,225	0,002
EE	28,440	0,023
GCG	28,110	0,059
OFE	0,524	0,008
OSA	1,565	0,012

\*n = 2

Leung, Koo e Guo (2006) [121] relataram o efeito da hidrólise dos ésteres metílico em biodiesel proveniente do óleo de colza. Após 50 semanas do biodiesel em contato com 5% de água (m/m) a 40 °C houve um acréscimo do índice de acidez em 0,62 unidade. Assim, os altos índices de acidez das amostras EE e GCG, apresentados na Tabela 19, não podem ser atribuídos somente ao efeito de hidrólise. Vale ressaltar que dentre as amostras analisadas a OFE apresentou menor índice de acidez, que pode estar relacionado ao grupo etoxi (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O<sup>-</sup>) ser um grupo abandonador pior que o metoxi (CH<sub>3</sub>O<sup>-</sup>) e ao fato do grupo etoxi proporcionar um impedimento estérico maior que o grupo metoxi no ataque nucleofílico (H<sub>2</sub>O) à carbonila do éster

para que se inicie a hidrólise. As amostras OFE e OSA apresentaram menor degradação hidrolítica dentre as amostras estudadas.

Schleicher *et al.*, (2009) [122] observaram que o biodiesel proveniente do óleo de colza submetido a presença de microorganismo na temperatura de 25 °C ocasionou um aumento significativo de 0,344% em massa de ácidos graxos livres após 94 dias de contato. De igual modo, nas mesmas condições citadas a estabilidade oxidativa caiu de 4,5 h para 2,0 h.

Bücker *et al.*, (2011) [123] avaliaram o efeito dos microorganismos *Aspergillus fumigatus*, *Paecilomyces sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Carterocephalus silvícola p* na degradação de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) oriundos de óleo de soja, no qual o potencial de degradação provocado por esses microrganismos variou de 0,29 – 20,99% (m/m) entre os FAME C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, C<sub>18:1</sub>, C<sub>18:2</sub>, C<sub>18:3</sub>.

Conforme mostra a Tabela 19, as amostras EE e GCG apresentaram índices de acidez semelhantes, 28,44 e 28,11 mg KOH g<sup>-1</sup>, respectivamente. Estas amostras são oriundas da espuma de esgoto e da gordura da caixa de gordura, e em termos de atividade microbiológica podem apresentar comportamentos análogos para o aumento da acidez e a estabilidade oxidativa. Logo, o aumento do índice de acidez nestas amostras pode ser um somatório da hidrólise dos ésteres mais o efeito da atividade microbiológica.

As amostras de misturas de ésteres deste trabalho foram derivatizadas com BSTFA e analisadas por GC/MS para verificar quais os principais ácidos graxos livres que contribuem para o aumento da acidez.

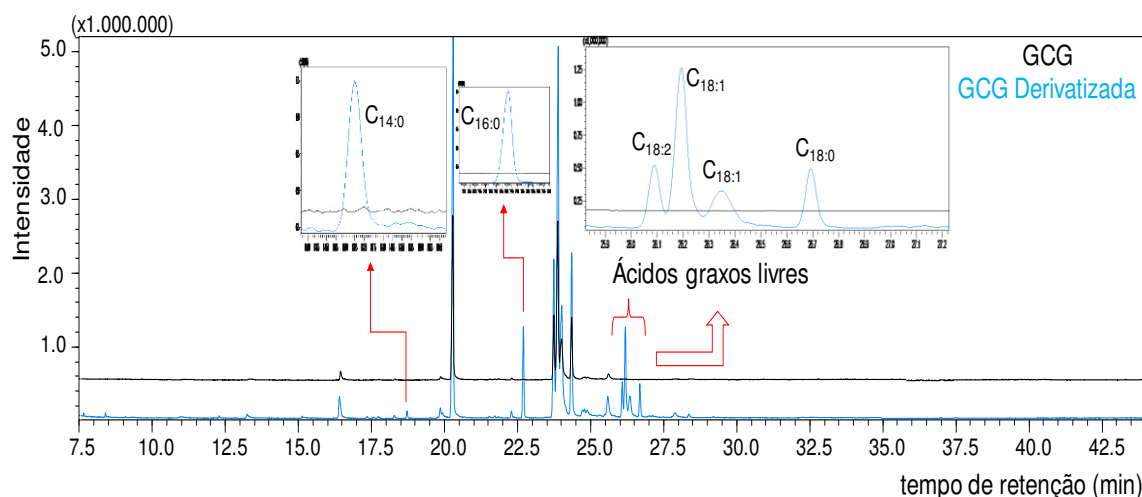
#### **4.7 Caracterização dos ácidos graxos livres por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC/MS)**

Em virtude das ligações de hidrogênio entre o grupo ácido da carboxila e os grupos silanóis contidos na coluna cromatográfica do equipamento, ácidos graxos livres de cadeia longa não são facilmente analisados por GC/MS [124]. Para que a análise se torne viável, o hidrogênio ácido da carboxila deve ser substituído por um grupo que torne a molécula apolar. Essa substituição pode ocorrer pela derivatização com BSTFA, em que o hidrogênio ácido da carboxila



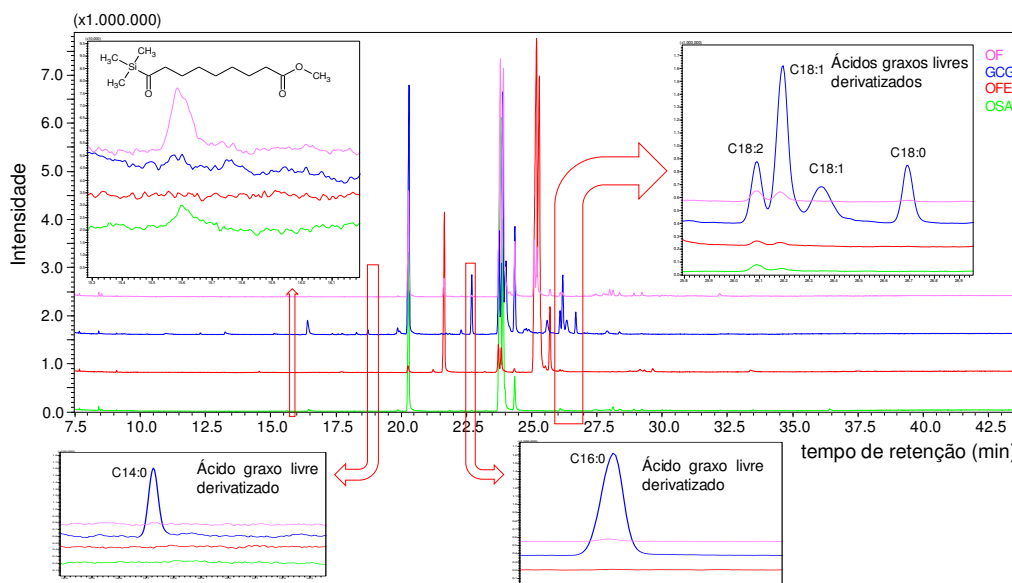
é substituído por um grupo trimetilsilano. A Figura 19 compara a análise da amostra GCG antes e após o processo de derivatização.

**Figura 19** – TICC da amostra GCG analisada por GC/MS antes e após a derivatização com BSTFA.



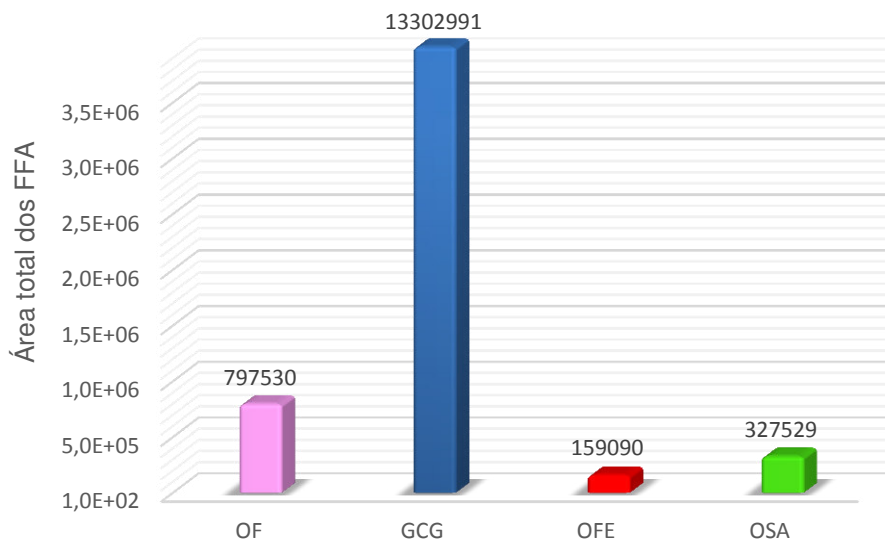
Conforme ilustra a Figura 19, nota-se claramente que os ácidos graxos livres na amostra GCG não foram identificados sem derivatização. Pelo TICC se observou que o ácido oleico na forma de ácido graxo livre derivatizado apresentou maior contribuição de contaminação, seguido da presença do ácido palmítico na forma de ácido graxo livre. A Figura 20 compara todas as amostras após o processo de derivatização.

**Figura 20** – TICC de todas as amostras de misturas de ésteres analisadas por GC/MS após a derivatização com BSTFA.



Conforme a Figura 20, pelo cromatograma da corrente total de íons das amostras de misturas de ésteres, nota-se que as intensidades dos picos dos ácidos graxos livres (FFA) seguiram os valores dos índices de acidez (IA) determinados no item 4.6. Como a amostra GCG apresentou maior IA, os picos referentes aos FFA apresentaram maiores intensidades do que nas outras AME. Uma vez que a altura dos picos referentes aos FFA estão diretamente ligadas a concentração deles presentes nas AME, há uma correlação entre o IA das AME e a altura dos picos dos FFA identificados em cada AME. A Figura 21 mostra a correlação do somatório das áreas referentes aos FFA integrados e identificados por GC/MS entre as amostras.

**Figura 21** – Área total dos ácidos graxos livres integrados e identificados nas amostras de misturas de ésteres por GC/MS e comparação entre as áreas totais das amostras.



O composto identificado no tempo de retenção ( $t_R$ ) de 15,584 min, apresentado na Tabela 20 apesar da baixa concentração merece destaque, visto que é um composto formado nas etapas finais do processo de degradação oxidativa das AME. Pela intensidade do sinal, foi observado que a contaminação desse composto foi maior na amostra OF. As amostras EE e GCG apresentaram maiores degradações pelo processo de hidrólise, resultando na formação de FFA. As amostras OF e OSA pela curva TG apresentaram maiores degradações resultando na formação de contaminantes de alta massa molecular com aproximadamente 12,44% (m/m) desses compostos em ambas as amostras. Dentre as AME estudadas, a OFE apresentou maior estabilidade a degradação oxidativa e a degradação por hidrólise durante o período de estocagem que foi de aproximadamente 3 anos. A Tabela 20 mostra os compostos identificados após a derivatização das AME.

**Tabela 20** – Compostos identificados por GC/MS após a derivatização das amostras de misturas de ésteres com BSTFA.

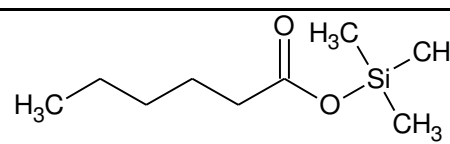
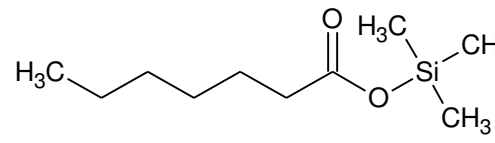
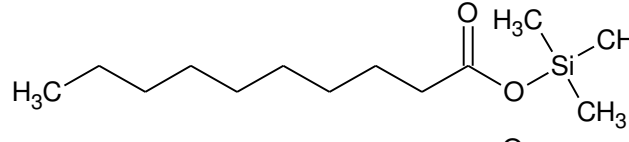
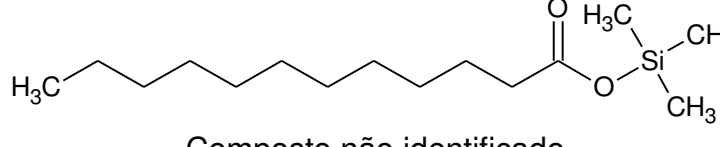
Amostras								Fórmula estrutural
OF		GCG		OFE		OSA		
Tempo de retenção (min)	Área relativa (%)	Tempo de retenção (min)	Área relativa (%)	Tempo de retenção (min)	Área relativa (%)	Tempo de retenção (min)	Área relativa (%)	
8,526	0,13	8,528	0,12	8,527	0,01	8,527	0,04	
-	-	9,378	0,03	-	-	-	-	
-	-	12,299	0,10	-	-	-	-	
-	-	15,134	0,06	-	-	-	-	
-	-	-	-	14,556	0,05	Composto não identificado		

Tabela 20  
Continuação

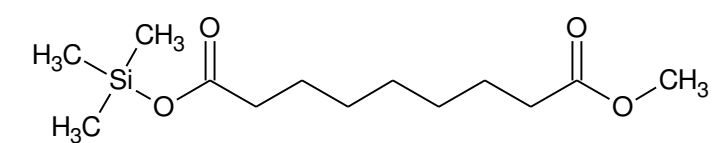
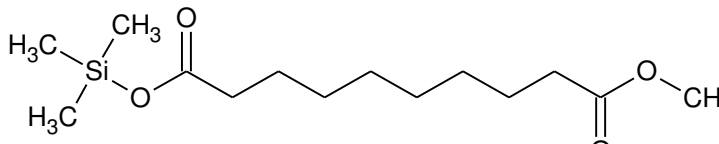
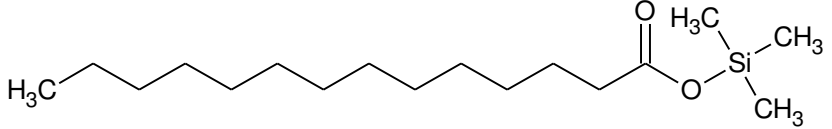
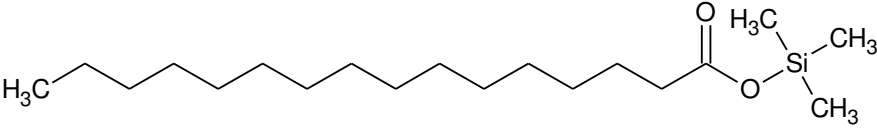
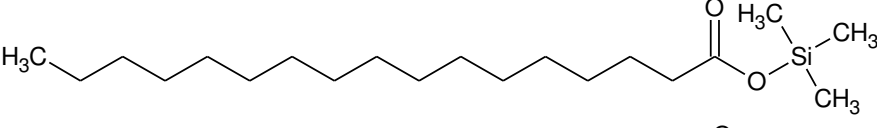
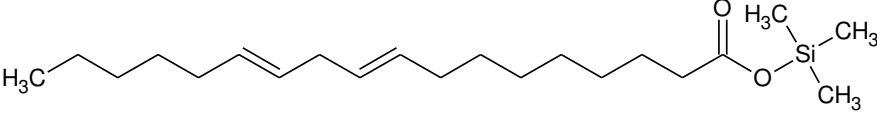
15,584	0,16	15,573	0,01	-	-	15,599	0,04	
-	-	17,357	0,09	-	-	-	-	
-	-	18,725	0,31	-	-	-	-	
-	-	20,686	0,02	-	-	-	-	Composto não identificado
22,696	0,12	22,706	4,41	22,702	0,02	22,692	0,07	
-	-	-	-	23,199	0,05	23,246	0,05	Composto não identificado
-	-	24,734	0,37	-	-	-	-	
26,088	0,32	26,088	1,79	26,088	0,09	26,088	0,24	

Tabela 20  
Continuação

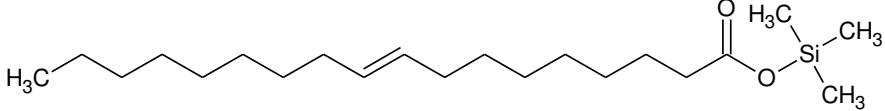
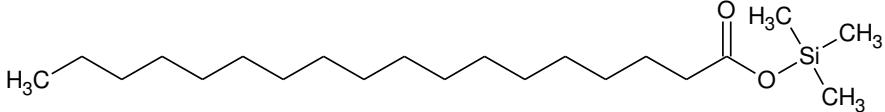
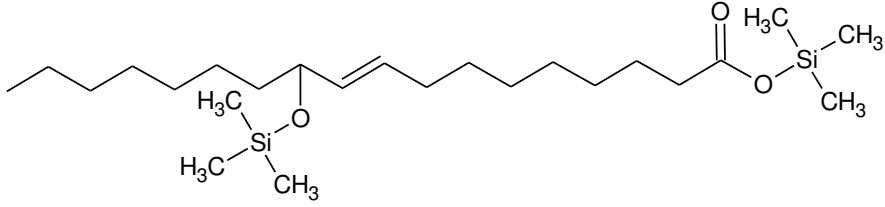
26,182	0,27	26,193	5,12	26,181	0,05	26,189	0,07	
-	-	26,348	2,10	-	-	-	-	Isômero do composto no tempo 26,182 min
26,691	0,06	26,692	1,66	-	-	-	-	
-	-	27,130	0,04	-	-	-	-	Isômero do composto no tempo 26,088 min
27,360	0,12	-	-	-	-	27,384	0,04	Composto não identificado
27,459	0,27	27,478	0,02	-	-	-	-	Composto não identificado
27,978	0,57	-	-	-	-	27,978	0,10	
07	0,56	-	-	28,102	0,03	28,108	0,43	Composto não identificado
28,909	0,29	-	-	-	-	28,914	0,20	Composto não identificado
-	-	-	-	29,150	0,19	-	-	Composto não identificado

Tabela 20  
Continuação

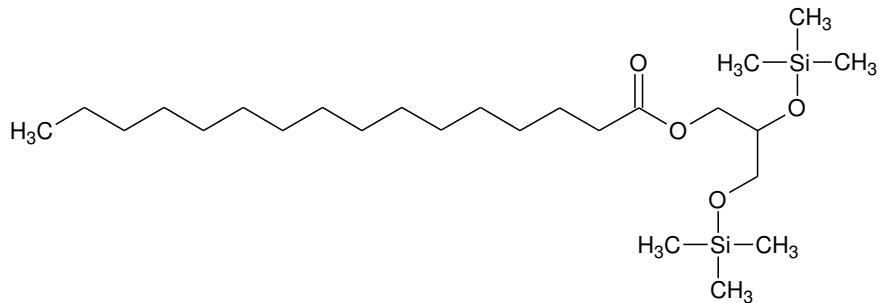
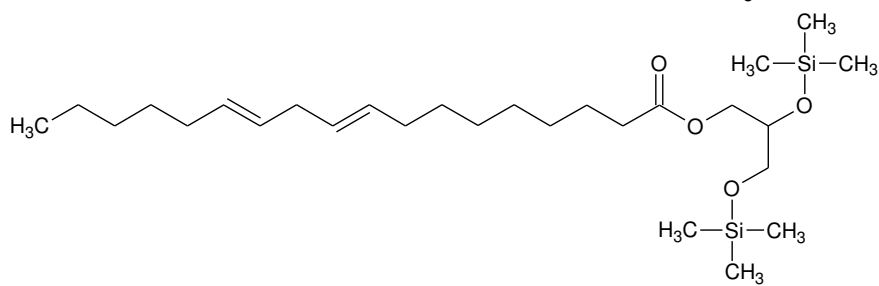
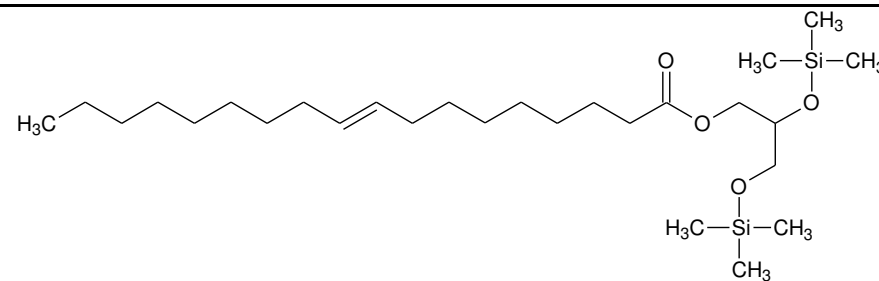
29,214	0,34	29,206	0,05	-	-	29,218	0,21	Composto não identificado
29,327	0,05	-	-	29,326	0,12	-	-	Composto não identificado
29,778	0,08	-	-	-	-	29,784	0,06	Composto não identificado
29,985	0,11	-	-	-	-	29,985	0,10	Composto não identificado
30,125	0,12	-	-	-	-	-	-	Composto não identificado
30,318	0,06	-	-	-	-	-	-	Composto não identificado
30,431	0,03	-	-	-	-	-	-	Composto não identificado
-	-	-	-	-	-	33,474	0,10	 <p>The structure shows a long-chain alkyl ester. The alkyl chain is a straight chain of 16 carbons, starting with a methyl group (H<sub>3</sub>C) on the left. The chain ends with a carboxylate group (C=O) which is esterified to a 2-(dimethylsilyloxy)ethyl group. The silicon atom is bonded to two methyl groups (CH<sub>3</sub>) and an oxygen atom that is part of the ether linkage.</p>
-	-	-	-	-	-	36,409	0,12	 <p>The structure shows a long-chain alkyl ester. The alkyl chain is a straight chain of 16 carbons, starting with a methyl group (H<sub>3</sub>C) on the left. The chain contains two double bonds (trans configuration) and ends with a carboxylate group (C=O) which is esterified to a 2-(dimethylsilyloxy)ethyl group. The silicon atom is bonded to two methyl groups (CH<sub>3</sub>) and an oxygen atom that is part of the ether linkage.</p>

Tabela 20  
Continuação

- - - - - 36,435 0,12





A acidez nas AME pode ser decorrente do aumento da formação de hidroperóxidos, visto que ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos são primeiramente oxidados para formar hidroperóxidos, que, em seguida podem ser submetidos a reações de clivagem homolítica gerando aldeídos reativos que são facilmente oxidados a ácidos. Assim, o teor de acidez nas AME também é acrescido com o aumento do período de armazenamento e como resultado da hidrólise dos FAME e dos FAEE [72].

De acordo com a Tabela 20, foi observado a presença dos FFA C<sub>6:0</sub>, C<sub>7:0</sub> e C<sub>10:0</sub> na amostra GCG. Segundo Carvalho *et al.*, (2016) [77] na revisão da literatura, observaram a identificação de ácidos carboxílicos com cadeias carbônicas de um a onze átomos de carbono oriundos da oxidação de lipídios. Portanto, como a amostra GCG apresentou menor teor de ésteres determinado por GC-FID entre as AME analisadas, a presença desses ácidos confirmou o alto nível de deterioração desta amostra.

#### 4.8 Índice de peróxidos determinados nas amostras de misturas de ésteres pelo método Cd 8-53

Os hidroperóxidos formados nas amostras de misturas de ésteres pela degradação oxidativa são considerados como produtos de oxidação primários, e podem ser determinados através do Método Cd 8-53. A Tabela 21 mostra os índices de peróxidos determinados nas AME.

**Tabela 21** – Índices de peróxidos determinados nas amostras de misturas de ésteres pelo Método Cd 8-53.

Amostras	Índice de peróxido (meq Kg <sup>-1</sup> )*	Desvio padrão (s)
OF	197,91	4,82
EE	38,23	0,24
GCG	19,42	0,02
OFE	49,03	0,02
OSA	196,23	0,08

\*n = 2

Os teores de ácidos graxos livres, de dímeros e de peróxidos tendem a aumentar durante um longo período de armazenamento em amostras de biodiesel. A presença majoritária de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos insaturados propicia a primeira etapa da degradação oxidativa, que ocorre devido à formação de radicais livres sobre a captação de hidrogênio dos grupos metileno vizinhos às ligações duplas dos FAME e FAEE insaturados, que, em seguida, reagem com o oxigênio atmosférico para formar hidroperóxidos, resultando em um aumento do seu valor de peróxido. Dentre as condições de armazenamento, o contato com o ar, a exposição a alta temperatura e a luz solar são os fatores que favorecem para degradação oxidativa em amostras de biodiesel e em amostras de misturas de ésteres [72]. A Tabela 22 mostra de forma resumida o tipo de contaminação determinada neste trabalho, assim como o nível de contaminação.

**Tabela 22** – Tipo de contaminação presente nas amostras de misturas de ésteres estudadas neste trabalho.

Tipo de contaminação	Amostra	Nível de contaminação
Peróxidos	OF, OSA	Alto
	OFE, EE, GCG	Moderado
	OF, EE, GCG	Alto
Ácidos graxos livres	OSA	Moderado
	OFE	Baixo
Compostos de alta massa molecular determinado pela curva termogravimétrica	OF, OSA	%12,44 (m/m)
	GCG	%6,91 (m/m)
	OFE	%4,72 (m/m)

Baixo = valor igual ou abaixo do valor máximo que a legislação determina; moderado = até 5 vezes maior do valor máximo determinado pela legislação; alto = acima de 5 vezes do valor máximo determinado pela legislação.

Os dados da Tabela 22 mostram o nível de contaminação das amostras de misturas de ésteres. Os hidroperóxidos, dímeros, di e triacilgliceróis foram elucidados pela técnica de EASI(+)-MS. De igual modo, os principais ácidos graxos livres que contribuem para o aumento do índice de acidez foram caracterizados pela técnica de EASI(-)-MS e GC/MS. Pela análise termogravimétrica (TG) foi possível determinar o percentual (m/m) de

contaminantes de alta massa molecular que envolve os dímeros, di e triacilgliceróis. No entanto, pela análise termogravimétrica não foi possível verificar o percentual de ácidos graxos livres em virtude dos FFA volatilizarem juntamente com os ésteres metílicos de ácidos graxos [97]. Assim, o teor de ésteres determinados por GC-FID e pela análise de TG poderão ser equivalentes caso a contaminação seja decorrente de compostos de alta massa molecular.

Com base nos resultados obtidos pela análise termogravimétrica e pela caracterização realizada da composição química dos contaminantes em amostras de misturas de ésteres pelas técnicas EASI(+)-MS, EASI(-)-MS, GC/MS e GC-FID, e pelos resultados das análises físico-químicas do índice de acidez e do índice de peróxido, o método de cromatografia em coluna aberta poderá ser otimizado para determinação do teor de contaminantes em amostras de misturas de ésteres.

#### **4.9 Otimização do método de cromatografia em coluna aberta (IUPAC, 2-507) aplicado na determinação do teor de ésteres e de contaminantes em amostras de misturas de ésteres**

Como critério para verificar a eficiência da separação dos contaminantes em amostras de misturas de ésteres pelo método de cromatografia em coluna aberta (CC), foi avaliado o teor de ésteres determinado por GC-FID da amostra bruta e da fração apolar obtida pelo método de CC. Na Tabela 23 são mostrados os resultados obtidos na otimização do método de cromatografia em coluna aberta para determinação do teor de contaminantes em amostras de misturas de ésteres. Os ensaios para otimização foram realizados com a amostra GCG.

**Tabela 23** – Resultados dos ensaios obtidos na otimização do método de cromatografia em coluna aberta para determinação do teor de contaminantes em amostras de misturas de ésteres utilizando 200 mg da amostra GCG.

Ensaio	Volume para empacotamento (mL)	Volume para eluição dos ésteres (mL)	Volume para eluição dos contaminantes (mL)	Diâmetro interno da coluna (mm)	Massa de adsorvente (g)	GC-FID	
						*Amostra bruta	Fração apolar
1º	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	10 <sup>e</sup>	0,8	5 (SiO <sub>2</sub> )	77,9±3,3	81,8
2º	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> )		89,2
3º	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 1:1) <sup>h</sup>		92,9
4º	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 1:1) <sup>i</sup>		85,9
5º	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 9:1) <sup>j</sup>		87,3
6º	20 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	10 <sup>f</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 9:1) <sup>j</sup>		84,1
7º	20 <sup>b</sup>	30 <sup>b</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> )		x
8º	20 <sup>b</sup>	30 <sup>c</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> )		x
9º	15 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> )		x
10º	15 <sup>g</sup>	30 <sup>g</sup>	10 <sup>e</sup>	0,6	5 (SiO <sub>2</sub> )		99,4

**a** = solução de hexano/éter etílico (9:1); **b** = hexano; **c** = solução de hexano/diclorometano (9:1); **e** = solução de éter etílico/acetonitrila (8:2); **f** = metanol; **g** = solução de hexano/diclorometano (7:3); **h** = Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na parte inferior da coluna e SiO<sub>2</sub> na parte superior da coluna; **i** = Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na parte superior da coluna e SiO<sub>2</sub> na parte inferior; **j** = adsorvente misturados; \* **n** = 10; **x** = massa insuficiente de amostra obtida para realizar a análise de determinação do teor de ésteres.

Conforme os dados da Tabela 23, no primeiro ensaio foi observado que a diminuição do diâmetro interno (d.i) da coluna cromatográfica proporcionou uma melhora no teor de ésteres (fração apolar) de 3,90% (m/m). Com a mesma massa de adsorvente e com o d.i da coluna cromatográfica menor, o comprimento da coluna será maior. Segundo Collins *et al.*, (2006) [125], o aumento do tamanho da coluna proporciona maior número de pratos teóricos, por conseguinte maior será a eficiência da coluna na separação dos constituintes da amostra.

No segundo ensaio, variando o d.i da coluna cromatográfica de 8 para 6 mm, foi obtido uma melhora no teor de ésteres depois da coluna (fração apolar) de 11,3% (m/m). No entanto, a amostra em estudo não apresentou o teor de ésteres mínimo de 96,5% (m/m) exigido pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP).

No terceiro ensaio, o preenchimento da coluna cromatográfica foi realizado com massas iguais de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) e alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). A parte inferior da coluna foi preenchida com  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e a parte superior da coluna foi preenchida com  $\text{SiO}_2$ . Nesse ensaio, foi obtido uma melhora de 15% (m/m) de ésteres após o processo de CC. Esta melhora pode ter ocorrido por intermédio das ligações de hidrogênio e das interações dipolo – dipolo da alumina com os contaminantes proporcionando uma melhora na separação entre os ésteres e os contaminantes.

Até o terceiro ensaio, foi observado uma melhora na purificação dos ésteres quando o d.i da coluna cromatográfica for de 6 mm. No entanto, não foi possível chegar até o mínimo de pureza de ésteres estabelecido pela ANP. De conhecimento pelas análises de GC/MS, EASI(+)-MS e EASI(-)MS, os contaminantes podem ser compostos com grupos funcionais (hidroperóxidos, hidroxila, ácidos carboxílicos) que agregam polaridade a molécula; e compostos (dímeros) com polaridade semelhante aos ésteres. Logo, pode ser que até o terceiro ensaio esteja ocorrendo a separação entre os ésteres e os compostos mais polares; e esteja ocorrendo a co-eluição entre os ésteres e os dímeros.

Nesta perspectiva, novos ensaios foram realizados diminuindo a força eluente da fase móvel e permanecendo com o d.i da coluna (6 mm) constante. Pois, compostos com maior massa molecular e com polaridade semelhante,

eluem mais lentamente que os análogos menores. Para avaliar o efeito do solvente de eluição da fração apolar, no sétimo ensaio foi diminuída a força eluente do solvente de eluição, trocando hexano:éter etílico (9:1) por hexano. Nesse ensaio, o uso de hexano não foi suficiente para dessorver os compostos da fase estacionária, que engloba os ésteres e os contaminantes. De igual modo, no oitavo e nono ensaios, utilizando hexano:diclorometano (9:1) como solvente de eluição o comportamento foi semelhante ao sétimo ensaio. O diclorometano foi escolhido para compor um dos solventes de eluição da fração apolar, representativa dos ésteres, por apresentar menor força de eluição frente ao éter etílico [125].

Portanto, no décimo ensaio foi alterada a proporção de hexano:diclorometano de 9:1 para 7:3. Com o aumento na proporção de diclorometano no solvente de eluição utilizado para fração apolar, houve um aumento na força de eluição suficiente para desorver os ésteres da fase estacionária e não os contaminantes, sendo que a fração apolar eluída com hexano:diclorometano na proporção de 7:3 apresentou pureza de 99,40% (m/m) de ésteres determinado por GC-FID.

Para avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos no décimo ensaio, o experimento foi repetido mais duas vezes e foram obtidos valores semelhantes. Assim, as condições obtidas no décimo ensaio foi aplicada as demais amostras. A Tabela 24 mostra os resultados obtidos com o método otimizado de cromatografia em coluna aberta aplicado nas amostras de misturas de ésteres deste trabalho.

**Tabela 24** – Tratamento das amostras de misturas de ésteres pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta com sílica desativada a 5% de água (m/m).

Amostras	%Percentagem das frações (m/m)		
	Fração apolar (Hex/Et <sub>2</sub> O)	Contaminantes teórico	Fração dos contaminantes práticos (Et <sub>2</sub> O/ACN)
*GCG	78,01±0,72	21,99±0,72	19,00±0,36
OF	65,22	34,78	32,02
OFE	85,63	14,37	10,39
OSA	79,26	20,74	13,11

\*n = 3

Conforme os dados da Tabela 24, foi observado que o método otimizado de cromatografia em coluna aberta apresentou boa reprodutibilidade na separação dos ésteres e dos contaminantes, visto que o desvio padrão amostral para n= 3 foi de 0,72, o que denota boa precisão do método. Analisando os resultados do percentual de contaminantes prático com o teórico, em todas as amostras houve um percentual de contaminantes que permaneceram adsorvidos no adsorvente. A amostra OSA apresentou maior percentual com 7,63% (m/m) de contaminantes que não foram eluídos utilizando Et<sub>2</sub>O/ACN na proporção de (8:2). Nesse caso, as interações dos contaminantes com a SiO<sub>2</sub> foram mais fortes que as interações do solvente de eluição com a SiO<sub>2</sub>.

Para confirmar o teor de ésteres (fração apolar) das amostras de misturas de ésteres determinado pelo método otimizado de CC, as AME tiveram seu teor de ésteres determinado por GC-FID e comparado com o método de CC otimizado. A Tabela 25 mostra o teor de ésteres obtido pelos dois métodos.

**Tabela 25** – Comparação do teor de ésteres das amostras de misturas de ésteres obtido pelo método de GC-FID e pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta.

Amostras	%Percentual de ésteres (m/m)	
	GC-FID	CC
GCG	*77,90±3,30	**78,0±0,72
OF	66,46	65,22
OFE	90,80	85,63
OSA	78,89	79,26

\*n= 10; \*\*n= 3

Na Tabela 25 é notável que o teor de ésteres determinado pelo método de GC-FID e de CC apresentaram valores próximos entre os dois métodos, onde a maior variação do teor de ésteres foi de 4,41% (m/m) para a amostra OFE. Vale ressaltar que, com o método de CC não otimizado a maior variação do teor de ésteres entre o método de GC-FID e CC foi de 12,94% (m/m) de ésteres na amostra GCG. Assim, o método otimizado de CC pode ser utilizado para se obter uma estimativa próxima do teor de ésteres em amostras de biodiesel e em amostras de misturas de ésteres.

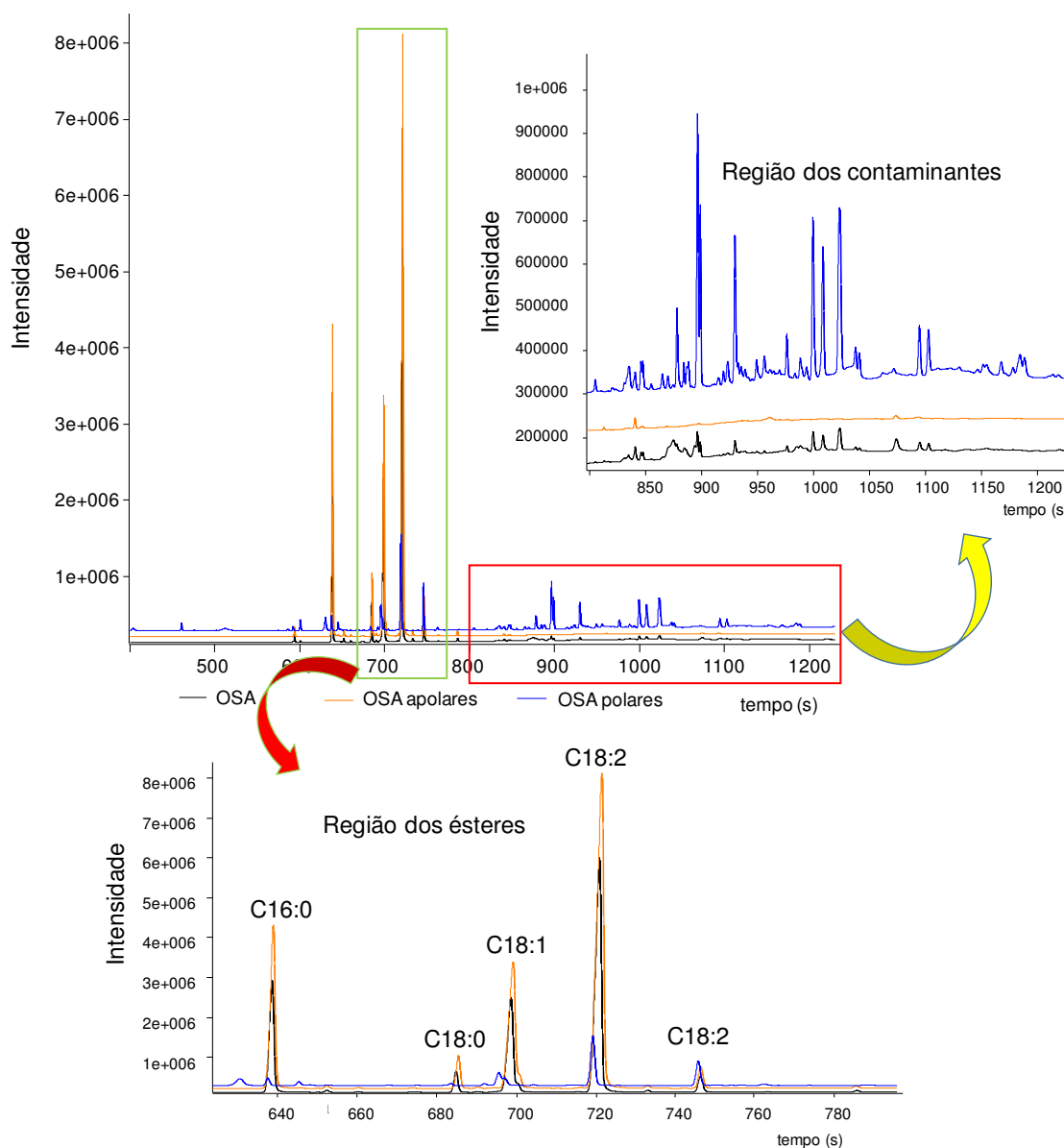
Da análise dos cromatogramas das amostras de misturas de ésteres, dos cromatogramas da fração apolar e dos cromatogramas da fração dos contaminantes obtidas pelo método otimizado de CC, embora alguns picos apareçam a partir de 800 s no cromatograma das amostras brutas, eles foram desconsiderados da integração para o cálculo do teor de ésteres, pois provavelmente não são ésteres, uma vez que pela sobreposição dos cromatogramas esses picos só foram observados na amostra bruta e na fração dos contaminantes, e não apareceram no cromatograma da fração apolar, sendo indicativo da presença de contaminantes oriundos da degradação oxidativa ou da degradação por hidrólise.

A Figura 22 mostra, como exemplo, o cromatograma obtido por GC-FID da amostra OSA bruta, da fração apolar e da fração dos contaminantes. Os cromatogramas foram ampliados para mostrar em destaque os picos (contaminantes) que foram desconsiderados da integração.

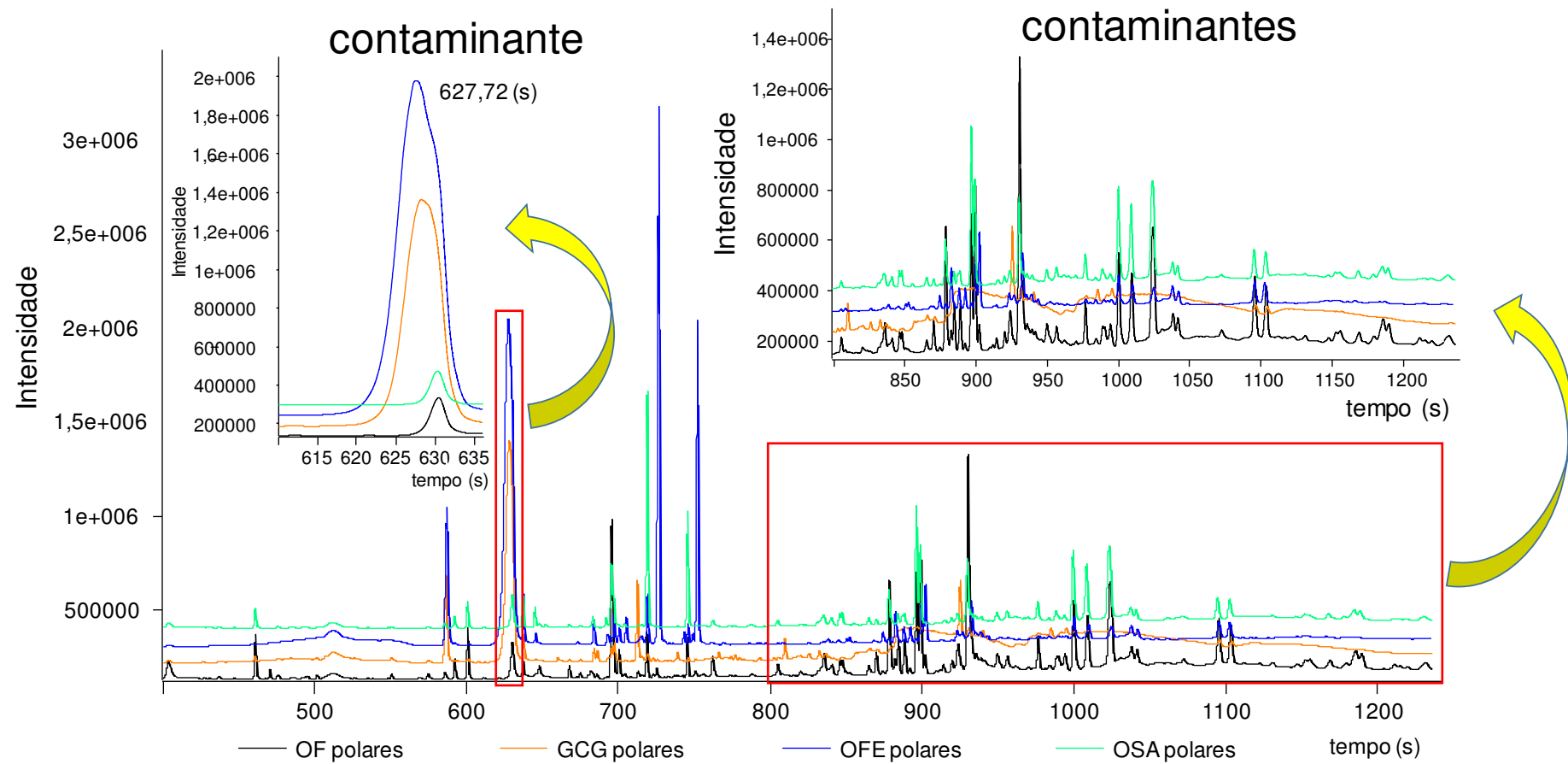


A Figura 23 mostra a sobreposição dos cromatogramas das análises por GC-FID de todas as frações dos contaminantes obtidas pelo método otimizado de CC referente a cada amostra estudada neste trabalho. As regiões dos contaminantes foram ampliadas para melhor visualização.

**Figura 22** – Cromatogramas das análises por GC-FID da amostra OSA bruta, da fração apolar e da fração dos contaminantes obtida pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta.



**Figura 23** – Cromatogramas das análises por GC-FID das frações dos contaminantes obtidas pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta das amostras de misturas de ésteres.



Na Figura 23 foi observado que todas as frações dos contaminantes das AME apresentaram semelhança no perfil cromatográfico a partir de 800 s. Esses picos foram classificados como contaminantes, pois na fração apolar representativa dos ésteres não foi observado a presença deles. Assim, esses compostos podem possuir grupos funcionais que acrescentam maior polaridade a molécula, justificando o fato deles não terem sido eluídos na fração apolar. No tempo de retenção de 627,72 s foi observado a presença de outro contaminante com maior contaminação para amostra OFE e GCG.

#### 4.10 Teor de ésteres determinado por GC-FID em amostras de misturas de ésteres e da fração apolar obtida pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta

Para confirmar a eficiência do método otimizado de cromatografia em coluna aberta aplicado na separação entre os ésteres e os contaminantes presentes nas amostras de misturas de ésteres, foi determinado o teor de ésteres de todas as frações apolares por GC-FID. Os resultados das análises são mostrados na Tabela 26.

**Tabela 26** – Teor de ésteres determinados por GC-FID das amostras de misturas de ésteres e das frações apolares (ésteres) obtidas pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta.

Amostras	%Percentual de ésteres (m/m)	
	GC-FID	Fração apolar
GCG	*77,90 $\pm$ 3,30	**100,1 $\pm$ 1,83
OF	66,46	102,20
OFE	90,85	98,33
OSA	78,89	103,06

\*n = 10; \*\*n = 3

Os dados da Tabela 26 mostraram que todas as frações apolares apresentaram percentuais de ésteres maiores que 96,5% (m/m), mínimo estabelecido pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e

Biocombustíveis. Desta forma, o método de CC otimizado pode ser classificado como eficiente na separação de contaminantes em amostras de misturas de ésteres. Com o percentual de ésteres maior que o mínimo estabelecido pela ANP, levando em consideração o parâmetro do teor de ésteres, as amostras deste trabalho podem enfim ser nomeadas como biodiesel.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstraram que é possível obter FAME e FAEE de fontes alternativas de TAG, tais como: óleo residual de fritura, espuma de esgoto e gordura da caixa de gordura. Esses, por sua vez, são matérias-primas de baixo valor econômico, que torna a pesquisa atrativa para caracterização da matéria-prima e das misturas de FAME e FAEE obtidos após o processo de transesterificação de óleos e gorduras.

A caracterização dos FAME e FAEE por GC/MS foi definitiva para avaliar a correlação dos FAME e FAEE identificados no EASI(+)-MS. De igual modo, pelo EASI(+)-MS foi possível caracterizar os principais contaminantes oriundos do processo de oxidação das amostras de misturas de ésteres, desde os contaminantes primários (hidroperóxidos) aos secundários que apresentam alta massa molecular (dímeros, DAG e TAG).

A análise termogravimétrica mostrou o percentual de contaminação dos compostos de alta massa molecular identificados no EASI(+)-MS. No qual, as amostras OF e OSA apresentaram maior contaminação por dímeros, DAG ou TAG. A presença dos dímeros foram confirmados pelos biomarcadores de  $m/z$  625, 673 e 689.

Pelo EASI(-)-MS foi possível identificar os ácidos graxos livres (FFA) presentes nas amostras de misturas de ésteres deste trabalho. Assim como, a identificação do íon de  $m/z$  421 na forma de dímero, formado pela condensação de uma parte da estrutura do ácido graxo livre (linoleico) com uma estrutura completa do mesmo.

Os índices de acidez das amostras de misturas de ésteres foram definitivos para comprovar quais delas possuem maior contaminação pela presença de FFA. Por GC/MS após a derivatização das amostras foi possível identificar quais os FFA majoritários presentes nas mesmas. As amostras EE e GCG, oriundas das matérias-primas espuma de esgoto e gordura da caixa de gordura, apresentaram maior contaminação por FFA que pode ser devido a atividade microbiológica maior nesse tipo de matriz.

Os resultados dos índices de peróxidos mostraram que as amostras OF e OSA apresentaram maior contaminação por hidroperóxido oriundos do processo oxidativo.

Com base na composição química das amostras de misturas de ésteres (AME) caracterizadas pelas técnicas EASI(+)-MS, EASI(-)-MS, GC/MS e GC-FID, e pelos resultados das análises físico-químicas do índice de acidez e do índice de peróxido, foi possível otimizar o método de cromatografia em coluna aberta (CC) para determinação do teor de ésteres e de contaminantes nas AME, o que resultou na obtenção da fração apolar de ésteres pura. Na otimização do método, a diminuição do diâmetro interno da coluna e a mudança da fase móvel foram definitivas para otimizar o método de CC, onde o uso da coluna cromatográfica com 6 mm de diâmetro interno, e o uso de hexano:diclorometrano (7:3) para eluição dos ésteres, e o uso de éter etílico:acetonitrila (8:2) para eluição dos contaminantes foram as condições ideais obtidas na otimização do método de CC.

## 6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

- Otimizar o método de cromatografia em coluna aberta para micro-escala aplicado na determinação do teor de ésteres e de contaminantes em amostras de misturas de ésteres.
- Avaliar o uso da espectrometria de massas na investigação de adulteração da proporção diesel/biodiesel.

## 7 REFERÊNCIAS

- [1] Ramkumar, S.; Kirubakaran, V. Biodiesel from Vegetable Oil as Alternate Fuel for C.I Engine and Feasibility Study of Thermal Cracking: A Critical Review. *Energy Conversion and Management* **2016**, *118*, 155–169.
- [2] Tolmasquim, M. T. Perspectivas e Planejamento do Setor Energético no Brasil. *SciELOBrazil* **2012**, *26*, 74, 247–260.
- [3] Nalgundwar, A.; Paul, B.; Sharma, S. K. Comparison of Performance and Emissions Characteristics of Di CI Engine Fueled with Dual Biodiesel Blends of Palm and Jatropha. *Fuel* **2016**, *173*, 172–179.
- [4] Hwang, J.; Bae, C.; Gupta, T. Application of Waste Cooking Oil (WCO) Biodiesel in a Compression Ignition Engine. *Fuel* **2016**, *176*, 20–31.
- [5] Amelio, A.; Van De Voorde, T.; Creemers, C.; Degreève, J.; Darvishmanesh, S.; Luis, P.; Van Der Bruggen, B. Comparison between Exergy and Energy Analysis for Biodiesel Production. *Energy* **2016**, *98*, 135–145.
- [6] Shiozawa, S.; Meirelles, A. J. A.; Batista, E. A. C. Liquid-Liquid Equilibrium Data for Systems Important in Biodiesel Production, Involving Vegetable Oils + Ethyl Esters + Monoacylglycerols and Diacylglycerols + Anhydrous Ethanol, at 303.15 and 318.15 K. *Fuel* **2016**, *180*, 333–342.
- [7] Datta, A.; Mandal, B. K. A Comprehensive Review of Biodiesel as an Alternative Fuel for Compression Ignition Engine. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2016**, *57*, 799–821.
- [8] ANP, 2016. Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural E Biocombustíveis. Boletim Mensal Do Biodiesel. **2016**, *Abril*.
- [9] MME, 2016. Ministério de Minas e Energia. Boletim Mensal Dos Combustíveis Renováveis. Edição N° 98, Abril.
- [10] MME, 2009. Ministério de Minas e Energia. *Plano Decenal de Expansão de Energia, 2008-2017*, Vol. 2.
- [11] Lohan, S. K.; Ram, T.; Mukesh, S.; Ali, M.; Arya, S. Sustainability of Biodiesel Production as Vehicular Fuel in Indian Perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2013**, *25*, 251–259.
- [12] Marinković, D. M.; Stanković, M. V.; Veličković, A. V.; Avramović, J. M.; Miladinović, M. R.; Stamenković, O. O.; Veljković, V. B.; Jovanović, D. M.



- Calcium Oxide as a Promising Heterogeneous Catalyst for Biodiesel Production: Current State and Perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2016**, *56*, 1387–1408.
- [13] Dágosto, M. D. A.; Vieira Da Silva, M. A.; De Oliveira, C. M.; Franca, L. S.; Da Costa Marques, L. G.; Murta, A. L. S.; De Freitas, M. A. V. Evaluating the Potential of the Use of Biodiesel for Power Generation in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2015**, *43*, 807–817.
- [14] Demirbas, A. Progress and Recent Trends in Biodiesel Fuels. *Energy Conversion and Management* **2009**, *50*, 14–34.
- [15] Lam, M. K.; Lee, K. T. Microalgae Biofuels: A Critical Review of Issues, Problems and the Way Forward. *Biotechnology Advances* **2012**, *30*, 673–690.
- [16] Anuar, M. R.; Abdullah, A. Z. Challenges in Biodiesel Industry with Regards to Feedstock, Environmental, Social and Sustainability Issues: A Critical Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2016**, *58*, 208–223.
- [17] Demirbas, A. Biodiesel Production via Non-Catalytic SCF Method and Biodiesel Fuel Characteristics. *Energy Conversion and Management* **2006**, *47*, 2271–2282.
- [18] Abbaszaadeh, A.; Ghobadian, B.; Omidkhah, M. R.; Najafi, G. Current Biodiesel Production Technologies: A Comparative Review. *Energy Conversion and Management* **2012**, *63*, 138–148.
- [19] Al-Hamamre, Z.; Yamin, J. Parametric Study of the Alkali Catalyzed Transesterification of Waste Frying Oil for Biodiesel Production. *Energy Conversion and Management* **2014**, *79*, 246–254.
- [20] Verma, P.; Sharma, M. P.; Dwivedi, G. Impact of Alcohol on Biodiesel Production and Properties. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2016**, *56*, 319–333.
- [21] Atadashi, I. M.; Aroua, M. K.; Abdul Aziz, A. R.; Sulaiman, N. M. N. The Effects of Catalysts in Biodiesel Production: A Review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2013**, *19*, 14–26.
- [22] Bi, C. hao; Min, M.; Nie, Y.; Xie, Q. long; Lu, Q.; Deng, X. yuan; Anderson, E.; Li, D.; Chen, P.; Ruan, R. Process Development for Scum to Biodiesel Conversion. *Bioresource Technology* **2015**, *185*, 185–193.

- [23] Atadashi, I. M.; Aroua, M. K.; Abdul Aziz, A. R.; Sulaiman, N. M. N. Production of Biodiesel Using High Free Fatty Acid Feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2012**, *16*, 3275–3285.
- [24] Corro, G.; Sánchez, N.; Pal, U.; Bañuelos, F. Biodiesel Production from Waste Frying Oil Using Waste Animal Bone and Solar Heat. *Waste Management* **2016**, *47*, 105–113.
- [25] Go, A. W.; Sutanto, S.; Ong, L. K.; Tran-Nguyen, P. L.; Ismadji, S.; Ju, Y. H. Developments in in-Situ (Trans) Esterification for Biodiesel Production: A Critical Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2016**, *60*, 284–305.
- [26] Issariyakul, T.; Dalai, A. K. Biodiesel from Vegetable Oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2014**, *31*, 446–471.
- [27] Adewale, P.; Dumont, M. J.; Ngadi, M. Recent Trends of Biodiesel Production from Animal Fat Wastes and Associated Production Techniques. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2015**, *45*, 574–588.
- [28] Skoronski, E.; De Oliveira, D. C.; Fernandes, M.; Da Silva, G. F.; Magalhães, M. D. L. B.; João, J. J. Valorization of Agro-Industrial by-Products: Analysis of Biodiesel Production from Porcine Fat Waste. *Journal of Cleaner Production* **2016**, *112*, 2553–2559.
- [29] da Cunha, M. E.; Krause, L. C.; Moraes, M. S. A.; Faccini, C. S.; Jacques, R. A.; Almeida, S. R.; Rodrigues, M. R. A.; Caramão, E. B. Beef Tallow Biodiesel Produced in a Pilot Scale. *Fuel Processing Technology* **2009**, *90*, 570–575.
- [30] Banković-Ilić, I. B.; Stojković, I. J.; Stamenković, O. S.; Veljkovic, V. B.; Hung, Y. T. Waste Animal Fats as Feedstocks for Biodiesel Production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2014**, *32*, 238–254.
- [31] Thamsiroj, T.; Murphy, J. D. How Much of the Target for Biofuels Can Be Met by Biodiesel Generated from Residues in Ireland? *Fuel* **2010**, *89*, 3579–3589.
- [32] Kumar, M. S.; Kerihuel, A.; Bellettre, J.; Tazerout, M. Experimental Investigations on the Use of Preheated Animal Fat as Fuel in a Compression Ignition Engine. *Renewable Energy* **2005**, *30*, 1443–1456.
- [33] Ramadhas, A. S.; Jayaraj, S.; Muraleedharan, C. Use of Vegetable Oils

- as I.C. Engine Fuels - A Review. *Renewable Energy* **2004**, *29*, 727–742.
- [34] Agarwal, D.; Kumar, L.; Agarwal, A. K. Performance Evaluation of a Vegetable Oil Fuelled Compression Ignition Engine. *Renewable Energy* **2008**, *33*, 1147–1156.
- [35] Teixeira, L. S. G.; Couto, M. B.; Souza, G. S.; Filho, M. A.; Assis, J. C. R.; Guimarães, P. R. B.; Pontes, L. A. M.; Almeida, S. Q.; Teixeira, J. S. R. Characterization of Beef Tallow Biodiesel and Their Mixtures with Soybean Biodiesel and Mineral Diesel Fuel. *Biomass and Bioenergy* **2010**, *34*, 438–441.
- [36] Teixeira, L. S. G.; Assis, J. C. R.; Mendonça, D. R.; Santos, I. T. V.; Guimarães, P. R. B.; Pontes, L. A. M.; Teixeira, J. S. R. Comparison between Conventional and Ultrasonic Preparation of Beef Tallow Biodiesel. *Fuel Processing Technology* **2009**, *90*, 1164–1166.
- [37] Doğan, T. H. The Testing of the Effects of Cooking Conditions on the Quality of Biodiesel Produced from Waste Cooking Oils. *Renewable Energy* **2016**, *94*, 466–473.
- [38] Sabudak, T.; Yildiz, M. Biodiesel Production from Waste Frying Oils and Its Quality Control. *Waste Management* **2010**, *30*, 799–803.
- [39] Jurac, Z.; Zlatar, V. Optimization of Raw Material Mixtures in the Production of Biodiesel from Vegetable and Used Frying Oils Regarding Quality Requirements in Terms of Cold Flow Properties. *Fuel Processing Technology* **2013**, *106*, 108–113.
- [40] Felizardo, P.; Correia, M. J. N.; Raposo, I.; Mendes, J. F.; Berkemeier, R.; Bordado, J. M. Production of Biodiesel from Waste Frying Oil. *Waste Management* **2006**, *26*, 487–494.
- [41] Atapour, M.; Kariminia, H. R.; Moslehabadi, P. M. Optimization of Biodiesel Production by Alkali-Catalyzed Transesterification of Used Frying Oil. *Process Safety and Environmental Protection* **2014**, *92*, 179–185.
- [42] Bril'kov, M.; Falck-Ytter, A. B.; Strætkvern, K. O. Evaluation of Methods for Reducing the Ash Content of Waste Frying Oil Processed to Biofuel Oil. *Fuel Processing Technology* **2015**, *134*, 487–493.
- [43] Sebastian, A.; Ghazani, S. M.; Marangoni, A. G. Quality and Safety of Frying Oils Used in Restaurants. *Food Research International* **2014**, *64*,

420–423.

- [44] Vieitez, I.; Callejas, N.; Irigaray, B.; Pinchak, Y.; Merlinski, N.; Jachmanián, I.; Grompone, M. A. Acid Value, Polar Compounds and Polymers as Determinants of the Efficient Conversion of Waste Frying Oils to Biodiesel. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **2014**, *91*, 655–664.
- [45] Da Silva Almeida, H.; Corrêa, O. A.; Eid, J. G.; Ribeiro, H. J.; De Castro, D. A. R.; Pereira, M. S.; Pereira, L. M.; De Andrade Mâncio, A. M.; Santos, M. C.; Da Silva Souza, J. A.; Borges, L. E. P.; Mendonça, N. M.; Machado, N. T. Production of Biofuels by Thermal Catalytic Cracking of Scum from Grease Traps in Pilot Scale. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2016**, *118*, 20–33.
- [46] Tu, Q.; McDonnell, B. E. Monte Carlo Analysis of Life Cycle Energy Consumption and Greenhouse Gas (GHG) Emission for Biodiesel Production from Trap Grease. *Journal of Cleaner Production* **2016**, *112*, 2674–2683.
- [47] Long, J. H.; Aziz, T. N.; Reyes, F. L. D. L.; Ducoste, J. J. Anaerobic Co-Digestion of Fat, Oil, and Grease (FOG): A Review of Gas Production and Process Limitations. *Process Safety and Environmental Protection* **2012**, *90*, 231–245.
- [48] Thompson, J. G.; Bertman, S.; Hill, S.; Kushner, L.; Miller, J. B. Using Headspace Solid Phase Microextraction to Evaluate the Odor Compounds in Trap Grease Feedstock for Biodiesel. *Biomass and Bioenergy* **2012**, *43*, 36–41.
- [49] Aguilar-Garnica, E.; Rodríguez-Palomera, F.; García-Sandoval, J. P.; Escalante, F. M. E. Dynamical Modeling for Biodiesel Production from Grease Trap Wastes. *Chemical Engineering Science* **2014**, *117*, 396–406.
- [50] Yan, J.; Li, A.; Xu, Y.; Ngo, T. P. N.; Phua, S.; Li, Z. Efficient Production of Biodiesel from Waste Grease: One-Pot Esterification and Transesterification with Tandem Lipases. *Bioresource Technology* **2012**, *123*, 332–337.
- [51] Yi, W.; Sha, F.; Xiaojuan, B.; Jingchan, Z.; Siqing, X. Scum Sludge as a Potential Feedstock for Biodiesel Production from Wastewater Treatment

- Plants. *Waste Management* **2016**, *47*, 91–97.
- [52] Pastore, C.; Lopez, A.; Lotito, V.; Mascolo, G. Biodiesel from Dewatered Wastewater Sludge: A Two-Step Process for a More Advantageous Production. *Chemosphere* **2013**, *92*, 667–673.
- [53] Olkiewicz, M.; Torres, C. M.; Jiménez, L.; Font, J.; Bengoa, C. Scale-up and Economic Analysis of Biodiesel Production from Municipal Primary Sewage Sludge. *Bioresource Technology* **2016**, *214*, 122–131.
- [54] Di Bitonto, L.; Lopez, A.; Mascolo, G.; Mininni, G.; Pastore, C. Efficient Solvent-Less Separation of Lipids from Municipal Wet Sewage Scum and Their Sustainable Conversion into Biodiesel. *Renewable Energy* **2016**, *90*, 55–61.
- [55] Razaviarani, V.; Buchanan, I. D.; Malik, S.; Katalambula, H. Pilot Scale Anaerobic Co-Digestion of Municipal Wastewater Sludge with Biodiesel Waste Glycerin. *Bioresource Technology* **2013**, *133*, 206–212.
- [56] Mu, D.; Addy, M.; Anderson, E.; Chen, P.; Ruan, R. A Life Cycle Assessment and Economic Analysis of the Scum-to-Biodiesel Technology in Wastewater Treatment Plants. *Bioresource Technology* **2016**, *204*, 89–97.
- [57] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções Do Agronegócio. Brasil 2014/2015 a 2024/2025 Projeções a Longo Prazo. 2015, p 133.
- [58] Faria, G. M. P. de; Oliveira, M. da S.; Carvalho, L. P. de; Cruz, C. D. Gains from Selection for Oil Content in Cotton. *Industrial Crops and Products* **2013**, *51*, 370–375.
- [59] Fernandes, D. M.; Serqueira, D. S.; Portela, F. M.; Assunção, R. M. N.; Munoz, R. A. A.; Terrones, M. G. H. Preparation and Characterization of Methylic and Ethylic Biodiesel from Cottonseed Oil and Effect of Tert-Butylhydroquinone on Its Oxidative Stability. *Fuel* **2012**, *97*, 658–661.
- [60] Atabani, A. E.; Silitonga, A. S.; Badruddin, I. A.; Mahlia, T. M. I.; Masjuki, H. H.; Mekhilef, S. A Comprehensive Review on Biodiesel as an Alternative Energy Resource and Its Characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2012**, *16*, 2070–2093.
- [61] Serqueira, D. S.; Fernandes, D. M.; Cunha, R. R.; Squissato, A. L.; Santos, D. Q.; Richter, E. M.; Munoz, R. A. A. Influence of Blending

- Soybean, Sunflower, Colza, Corn, Cottonseed, and Residual Cooking Oil Methyl Biodiesels on the Oxidation Stability. *Fuel* **2014**, *118*, 16–20.
- [62] Panagiotopoulos, I. A.; Pasias, S.; Bakker, R. R.; Vrije., T. de; Papayannakos, N.; Claassen, P. A. M.; Koukios, E. G. Biodiesel and Biohydrogen Production from Cotton-Seed Cake in a Biorefinery Concept. *Bioresource Technology* **2013**, *136*, 78–86.
- [63] Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP N° 45 de Agosto de 2014. **2014**.
- [64] Bouaid, A.; Vázquez, R.; Martinez, M.; Aracil, J. Effect of Free Fatty Acids Contents on Biodiesel Quality. Pilot Plant Studies. *Fuel* **2016**, *174*, 54–62.
- [65] Fernando, S.; Karra, P.; Hernandez, R.; Jha, S. K. Effect of Incompletely Converted Soybean Oil on Biodiesel Quality. *Energy* **2007**, *32*, 844–851.
- [66] Marques, M. V.; Naciuk, F. F.; Mello, A. M. de S.; Seibel, N. M.; Fontoura, L. A. M. Determinação Do Teor de Ésteres Graxos Em Biodiesel Metílico de Soja Por Cromatografia Gasosa Utilizando Oleato de Etila Como Padrão Interno. *Química Nova* **2010**, *33* (4), 978–980.
- [67] NBR 15764. BIODIESEL – Determinação Do Teor Total de Ésteres Por Cromatografia Gasosa. *Associação Brasileira de Normas Técnicas* **2009**.
- [68] EN 14103. Fat and Oil Derivatives – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of Ester and Linolenic Acid Methyl Ester Contents. *British Standar* **2011**.
- [69] Paula, A. J. A. de; Krügel, M.; Miranda, J. P.; Rossi, L. F. dos S.; Neto, P. R. da C. Utilização de Argilas Para Purificação de Biodiesel. *Química Nova* **2011**, *34* (1), 91–95.
- [70] Yaakob, Z.; Narayanan, B. N.; Padikkaparambil, S.; Unni, S. K.; Akbar, M. P. A Review on the Oxidation Stability of Biodiesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2014**, *35*, 136–153.
- [71] Saluja, R. K.; Kumar, V.; Sham, R. Stability of Biodiesel – A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2016**, *62*, 866–881.
- [72] Jose, T. K.; Anand, K. Effects of Biodiesel Composition on Its Long Term Storage Stability. *Fuel* **2016**, *177*, 190–196.
- [73] Fotouo-M., H.; Toit, E. S. du.; Robbertse, P. J. Effect of Storage Conditions on Moringa Oleifera Lam. Seed Oil: Biodiesel Feedstock Quality. *Industrial Crops and Products* **2016**, *84*, 80–86.

- [74] Ramalingam, S.; Govindasamy, M.; Ezhulumalai, M.; Kaliyaperumal, A. Effect of Leaf Extract from *Pongamia Pinnata* on the Oxidation Stability, Performance and Emission Characteristics of *Calophyllum* Biodiesel. *Fuel* **2016**, *180*, 263–269.
- [75] Focke, W. W.; Westhuizen, I. Van Der; Grobler, A. B. L.; Nshoane, K. T.; Reddy, J. K.; Luyt, A. S. The Effect of Synthetic Antioxidants on the Oxidative Stability of Biodiesel. *Fuel* **2012**, *94*, 227–233.
- [76] Dantas, M. B.; Albuquerque, A. R.; Barros, A. K.; Filho, M. G. R.; Filho, N. R. A.; Sinfrônio, F. S. M.; Rosenhaim, R.; Soledade, L. E. B.; Santos, I. M. G.; Souza, A. G. Evaluation of the Oxidative Stability of Corn Biodiesel. *Fuel* **2011**, *90*, 773–778.
- [77] Carvalho, A. L. de; Cardoso, E. A.; Rocha, G. O. da; Teixeira, L. S. G.; Pepe, I. M.; Grosjean, D. M. Carboxylic Acid Emissions from Soybean Biodiesel Oxidation in the EN14112 (Rancimat) Stability Test. *Fuel* **2016**, *173*, 29–36.
- [78] Pullen, J.; Saeed, K. An Overview of Biodiesel Oxidation Stability. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2012**, *16*, 5924–5950.
- [79] Agarwal, A. K.; Khurana, D. Long-Term Storage Oxidation Stability of Karanja Biodiesel with the Use of Antioxidants. *Fuel Processing Technology* **2013**, *106*, 447–452.
- [80] Jakeria, M. R.; Fazal, M. A.; Haseeb, A. S. M. A. Influence of Different Factors on the Stability of Biodiesel: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2014**, *30*, 154–163.
- [81] Prince, R. C.; Haitmanek, C.; Lee, C. C. The Primary Aerobic Biodegradation of Biodiesel B20. *Chemosphere* **2008**, *71*, 1446–1451.
- [82] DeMello, J. A.; Carmichael, C. A.; Peacock, E. E.; Nelson, R. K.; Arey, J. S.; Reddy, C. M. Biodegradation and Environmental Behavior of Biodiesel Mixtures in the Sea: An Initial Study. *Marine Pollution Bulletin* **2007**, *54*, 894–904.
- [83] Pardo, V. L.; Fagundes, C. A. M.; Caldas, S. S.; Kurz, M. H.; Clementin, R. M.; D'Oca, M. G. M.; Primel, E. G. Development and Validation of a Method for the Determination of Fatty Acid Methyl Ester Contents in Tung Biodiesel and Blends. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2012**, *89*, 631–637.

- [84] Dignac, M. F.; Ginestet, P.; Rybacki, D.; Bruchet, A.; Urbain, V.; Scribe, P. Fate of Wastewater Organic Pollution during Activated Sludge Treatment: Nature of Residual Organic Matter. *Water Research* **2000**, *34* (17), 4185–4194.
- [85] Saraiva, S. A.; Cabral, E. C.; Eberlin, M. N.; Catharino, R. R. Amazonian Vegetable Oils and Fats: Fast Typification and Quality Control via Triacylglycerol (TAG) Profiles from Dry Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57* (10), 4030–4034.
- [86] Wu, Z.; Rodgers, R. P.; Marshall, a G. Characterization of Vegetable Oils: Detailed Compositional Fingerprints Derived from Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 5322–5328.
- [87] Catharino, R. R.; Milagre, H. M. S.; Saraiva, S. A.; Garcia, C. M.; Schuchardt, U.; Eberlin, M. N. Biodiesel Typification and Quality Control by Direct Infusion Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting. *Energy & Fuels* **2007**, *21* (06), 3698–3701.
- [88] Simas, R. C.; Catharino, R. R.; Cunha, I. B. S.; Cabral, E. C.; Barrera-Arellano, D.; Eberlin, M. N.; Alberici, R. M. Instantaneous Characterization of Vegetable Oils via TAG and FFA Profiles by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. *Analyst* **2010**, *135*, 738–744.
- [89] Abdelnur, P. V.; Eberlin, L. S.; Sá, G. F. de; De Souza, V.; Eberlin, M. N. Single-Shot Biodiesel Analysis: Nearly Instantaneous Typification and Quality Control Solely by Ambient Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 7882–7886.
- [90] Júnior, O. O. S.; Montanher, P. F.; Bonafé, E. G.; Maruyama, S. A.; Carbonera, F.; Alberici, R. M.; Eberlin, M. N.; Visentainer, J. V. Efficiencies of Acid and Base-Catalyzed Methylation of Vegetable Oils by Ambient Mass Spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2013**, *24* (11), 1764–1771.
- [91] Cabral, E. C.; da Cruz, G. F.; Simas, R. C.; Sanvido, G. B.; Gonçalves, L. de V.; Leal, R. V. P.; da Silva, R. C. F.; da Silva, J. C. T.; Barata, L. E. S.;



- da Cunha, V. S.; de França, L. F.; Daroda, R. J.; de Sá, G. F.; Eberlin, M. N. Typification and Quality Control of the Andiroba (*Carapa Guianensis*) Oil via Mass Spectrometry Fingerprinting. *Analytical Methods* **2013**, *5*, 1385–1391.
- [92] Dos Santos, F. N.; Santos, J. M.; Mesquita, P. R. R.; Oliveira, K. B.; Rodrigues, F. M.; Lopes, W. A.; Eberlin, M. N. Immediate Differentiation of Unusual Seed Oils by Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry and Chemometric Analysis. *Analytical Methods* **2016**, *8*, 3681–3690.
- [93] Pereira, G. G.; Alberici, R. M.; Fernandes, G. D.; Cunha, I. B. S.; Eberlin, M. N.; Dobarganes, M. C.; Daroda, R. J.; Barrera-Arellano, D. Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry for Rapid Monitoring of Secondary Oxidation Products in Biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2014**, *116*, 952–960.
- [94] Nik, W. B. W.; Ani, F. N.; Masjuki, H. H. Thermal Stability Evaluation of Palm Oil as Energy Transport Media. *Energy Conversion and Management* **2005**, *46*, 2198–2215.
- [95] Jain, S.; Sharma, M. P. Thermal Stability of Biodiesel and Its Blends: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2011**, *15*, 438–448.
- [96] Oliveira, L. E.; Giordani, D. S.; Paiva, E. M.; De Castro, H. F.; da Silva, M. L. C. P. Kinetic and Thermodynamic Parameters of Volatilization of Biodiesel from Babassu, Palm Oil and Mineral Diesel by Thermogravimetric Analysis (TG). *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2013**, *111*, 155–160.
- [97] Sousa, F. P.; Luciano, M. A.; Pasa, V. M. D. Thermogravimetry and Viscometry for Assessing the Ester Content (FAME and FAEE). *Fuel Processing Technology* **2013**, *109*, 133–140.
- [98] Çaylı, G.; Küsefoğlu, S. Increased Yields in Biodiesel Production from Used Cooking Oils by a Two Step Process: Comparison with One Step Process by Using TGA. *Fuel Processing Technology* **2008**, *89*, 118–122.
- [99] Zhao, H.; Cao, Y.; Orndorff, W.; Cheng, Y. H.; Pan, W. P. Thermal Behaviors of Soy Biodiesel. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2012**, *109*, 1145–1150.
- [100] Kok, M. V.; Topa, E. Thermal Characterization and Model-Free Kinetics of

- Biodiesel Sample. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2015**, *122*, 955–961.
- [101] Farias, A. F. F.; da Conceição, M. M.; Cavalcanti, E. H. S.; Melo, M. A. R.; dos Santos, I. M. G.; de Souza, A. G. Analysis of Soybean Biodiesel Additive with Different Formulations of Oils and Fats. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2016**, *123*, 2121–2127.
- [102] Vega-Lizama, T.; Díaz-Ballote, L.; Hernández-Mézquita, E.; May-Crespo, F.; Castro-Borges, P.; Castillo-Atoche, A.; González-García, G.; Maldonado, L. Thermogravimetric Analysis as a Rapid and Simple Method to Determine the Degradation Degree of Soy Biodiesel. *Fuel* **2015**, *156*, 158–162.
- [103] Huang, Z.; Zhang, P.; Sun, Y.; Huang, Y.; Pan, Z.; Wang, L. Determination of Glyceride and Free Fatty Acid Residuals in Biodiesel by Thin Layer Chromatography Combined with on-Line Pyrolytic Methylation Gas Chromatography. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2015**, *113*, 288–295.
- [104] Chen, W.-A.; Chiu, C. P.; Cheng, W.-C.; Hsu, C.-K.; Kuo, M.-I. Total Polar Compounds and Acid Values of Repeatedly Used Frying Oils Measured by Standard and Rapid Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **2013**, *21* (1), 58–65.
- [105] CEDEA. No Title [http://www.cedea.com.br/conheca\\_centros](http://www.cedea.com.br/conheca_centros) (accessed Jul 1, 2016).
- [106] IUPAC. Standar Method 2.507: Determination of Polar Compounds in Frying Fats. In: Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th Ed. (Ed. International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell, Oxford). **1987**.
- [107] Márquez-Ruiz, G.; NOVAIS, J. A. Determination of Polar Compounds in Used Frying Oils and Fats by Adsorption Chromatography. *The Lipid Library* **2009**, *10*.
- [108] D664, A. *Petrochemical Oils. Total Acid Number (TAN)*, Abril, 2<sup>a</sup>.; 2015.
- [109] SOCIETY, A. O. C. *Official Methods and Recommended Praticces of the American Oil Chemists Society.*, 4<sup>a</sup>.; Champaing: USA, 1990.
- [110] Prados, C. P.; Rezende, D. R.; Batista, L. R.; Alves, M. I. R.; Filho, N. R. A. Simultaneous Gas Chromatographic Analysis of Total Esters, Mono-,

- Di- and Triacylglycerides and Free and Total Glycerol in Methyl or Ethyl Biodiesel. *Fuel* **2012**, *96*, 476–481.
- [111] Collard, M.; Teychené, B.; Lemée, L. Improved Quantitative Analysis of Molecular Constituents of Wastewater Sludge Pellets Using Double-Shot Thermochemolysis-GCMS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2015**, *114*, 265–272.
- [112] Dias, J. M.; Alvim-Ferraz, M. C. M.; Almeida, M. F. Production of Biodiesel from Acid Waste Lard. *Bioresource Technology* **2009**, *100*, 6355–6361.
- [113] Márquez-Ruiz, G.; Jorge, N.; Martín-Polvillo, M.; Dobarganes, M. C. Rapid, Quantitative Determination of Polar Compounds in Fats and Oils by Solid-Phase Extraction and Size-Exclusion Chromatography Using Monostearin as Internal Standard. *Journal of Chromatography A* **1996**, *749*, 55–60.
- [114] Issariyakul, T.; Kulkarni, M. G.; Dalai, A. K.; Bakhshi, N. N. Production of Biodiesel from Waste Fryer Grease Using Mixed Methanol/ethanol System. *Fuel Processing Technology* **2007**, *88*, 429–436.
- [115] Alberici, R. M.; Simas, R. C.; de Souza, V.; de Sá, G. F.; Daroda, R. J.; Eberlin, M. N. Analysis of Fuels via Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *659*, 15–22.
- [116] Fernandes, A. M. A. P.; Eberlin, M. N.; Silva, P. R. M.; Silva, S. R.; Cunha, V. S.; Daroda, R. J.; Alberici, R. M. Unsaturation Levels in Biodiesel via Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry. *Fuel* **2014**, *128*, 99–103.
- [117] Godoy, A. T.; Pereira, G. G.; Ferreira, L. L.; Cunha, I. B. S.; Barrera-Arellano, D.; Daroda, R. J.; Eberlin, M. N.; Alberici, R. M. Biodiesel Oxidation Monitored by Ambient Desorption/ionization Mass Spectrometry. *Energy and Fuels* **2013**, *27*, 7455–7459.
- [118] Nawar, W. W. Chemical Changes in Lipids Produced by Thermal Processing. *Journal of Chemical Education* **1984**, *61*, 299–302.
- [119] Alberici, R. M.; de Souza, V.; de Sá, G. F.; Morelli, S. R.; Eberlin, M. N.; Daroda, R. J. Used Frying Oil: A Proper Feedstock for Biodiesel Production? *Bioenergy Research* **2012**, *5*, 1002–1008.
- [120] Riccio, M. F.; Sawaya, A. C. H. F.; Abdelnur, P. V.; Saraiva, S. A.;

- Haddad, R.; Eberlin, M. N.; Catharino, R. R. Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometric of Olive Oils: Quality Control and Certification of Geographical Origin. *Analytical Letters* **2011**, *44*, 1489–1497.
- [121] Leung, D. Y. C.; Koo, B. C. P.; Guo, Y. Degradation of Biodiesel under Different Storage Conditions. *Bioresource Technology* **2006**, *97*, 250–256.
- [122] Schleicher, T.; Werkmeister, R.; Russ, W.; Meyer-Pittroff, R. Microbiological Stability of Biodiesel-Diesel-Mixtures. *Bioresource Technology* **2009**, *100*, 724–730.
- [123] Bucker, F.; Santestevan, N. A.; Roesch, L. F.; Jacques, R. J. S.; Peralba, M. do C. R.; Camargo, F. A. de O.; Bento, F. M. Impact of Biodiesel on Biodeterioration of Stored Brazilian Diesel Oil. *International Biodeterioration and Biodegradation* **2011**, *65*, 172–178.
- [124] Tonhi, E.; Collins, K. E.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H. Fases Estacionárias Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Em Fase Reversa (CLAE-FR) Baseadas Em Superfícies de óxidos Inorgânicos Funcionalizados. *Química Nova* **2002**, *25* (4), 616–623.
- [125] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*.; Editora da UNICAMP: Campinas, 2006, 452p.

## 8 ANEXOS

**Tabela 27 – Especificação do Biodiesel**

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII (1) (2)	-	-	-
Massa específica a 20°C	kg/m³	850 a 900	7148 14065	1298 4052	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm²/s	3,0 a 6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água, máx.	mg/kg	200,0 (3)	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx. (13)	mg/kg	24	15995	-	EN12662 (5)
Ponto de fulgor, mín. (4)	°C	100	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103 (5)
Cinzas sulfatadas, máx. (6)	% massa	0,02	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/kg	10	15867	5453	EN ISO 20846 EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	15554 15555 15553 15556	-	EN 14108 (5) EN 14109 (5) EN 14538 (5)
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	15553 15556	-	EN 14538 (5)
Fósforo, máx. (7)	mg/kg	10	15553	4951	EN 14107 (5) EN 16294 (5)
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx. (6)	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número Cetano (6)	-	Anotar	-	613 6890 (8)	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	-9	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,5	14448 -	664 -	EN 14104 (5)

Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15771	6584 (5)	EN 14105 (5)
			15908 (5)	-	EN 14106 (5)
			-	-	-
Glicerol total, máx. (10)	% massa	0,25	15344	6584 (5)	EN 14105 (5)
			15908 (5)	-	-
			-	-	-
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,7	15342 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
			15344	-	-
			15908 (5)	-	-
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,2	15342 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
			15344	-	-
			15908 (5)	-	-
Triacilglicerol, máx.	% massa	0,2	15342 (5)	6584 (5)	EN 14105 (5)
			15344	-	-
			15908 (5)	-	-
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,2	15343	-	EN 14110 (5)
Índice de Iodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111 (5)
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín. (11)	h	6 (12)	-	-	EN 14112 (5) EN 15751 (5)

FONTE: Resolução Nº 45 da ANP, 2014 [Erro! Fonte de referência não encontrada.].

#### Notas aplicadas a Tabela 27:

(1) Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura de ensaio. Em caso de disputa, o produto só poderá ser considerado como não especificado no Aspecto, caso os parâmetros teor de água e/ou contaminação total estejam não conformes.

(2) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade no Aspecto, deverão ser realizadas as análises de teor de água e contaminação total. O produto será reprovado caso pelo menos um desses dois últimos parâmetros esteja fora de especificação.

(3) Para efeito de fiscalização, nas autuações por não conformidade, será admitida variação de +50 mg/kg no limite do teor de água no biodiesel para o produtor e de +150 mg/kg para o distribuidor.

(4) Quando a análise de ponto de fulgor resultar em valor superior a 130°C, fica dispensada a análise de teor de metanol ou etanol.

(5) Os métodos referenciados demandam validação para os materiais graxos não previstos no método e rota de produção etílica.

(6) Estas características devem ser analisadas em conjunto com as demais constantes da Tabela de Especificação a cada trimestre civil. Os resultados devem ser enviados à ANP pelo Produtor de biodiesel, tomando uma amostra do biodiesel comercializado no trimestre e, em caso de neste período haver mudança de tipo de material graxo, o Produtor deverá analisar número de amostras correspondente ao número de tipos de materiais graxos utilizados.

(7) Em caso de disputa, deve ser utilizado o método EN 14107 como referência.

(8) O método ASTM D6890 poderá ser utilizado como método alternativo para determinação do número de cetano.

(9) Limites conforme Tabela II. Para os estados não contemplados na tabela o ponto de entupimento a frio permanecerá 19°C.

(10) Poderá ser determinado pelos métodos ABNT NBR 15908, ABNT NBR 15344, ASTM D6584 ou EN14105, sendo aplicável o limite de 0,25% em massa. Para biodiesel oriundo de material graxo predominantemente láurico, deve ser utilizado método ABNT NBR 15908 ou ABNT NBR 15344, sendo aplicável o limite de 0,30% em massa.

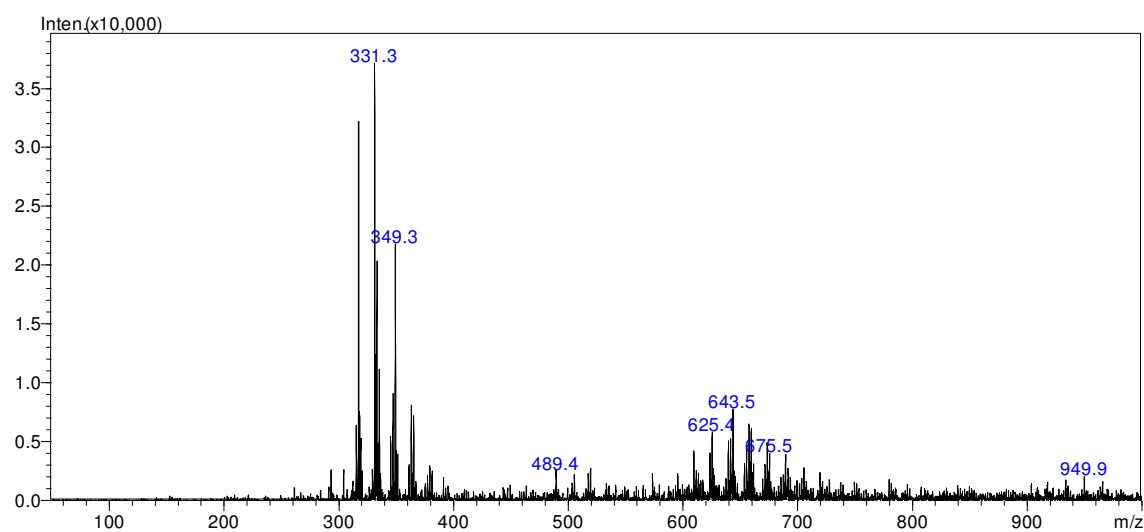
(11) O limite estabelecido deverá ser atendido em toda a cadeia de abastecimento do combustível.

(12) A estabilidade à oxidação a 110 °C terá seu limite mínimo de 8 horas, a partir de 1º de novembro de 2014.

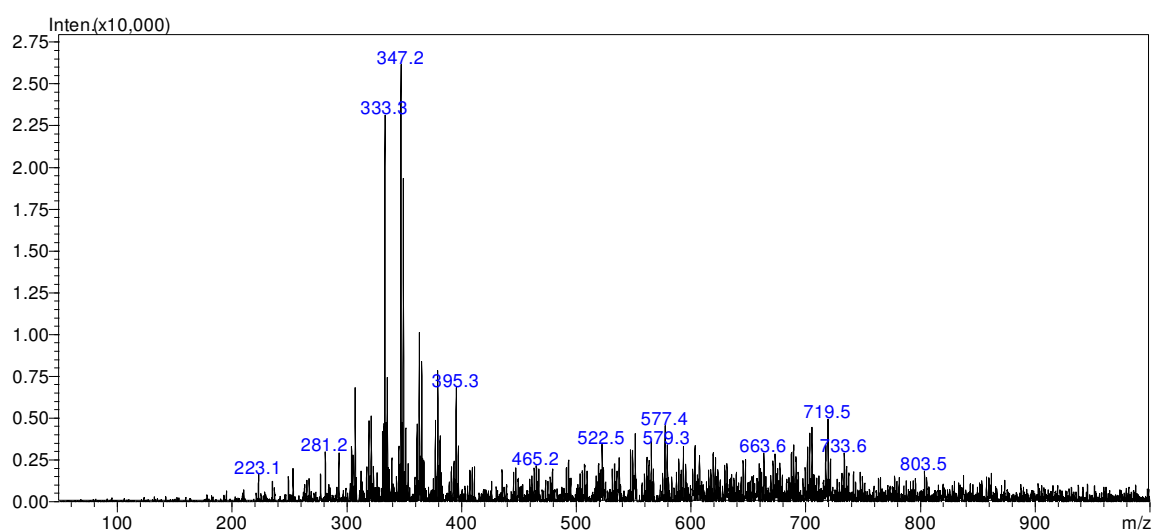
(13) Deverá ser utilizada somente a versão da norma de 1998 ou 2008 (EN 12662:1998 ou EN 12662:2008)

## 9 APÊNDICES

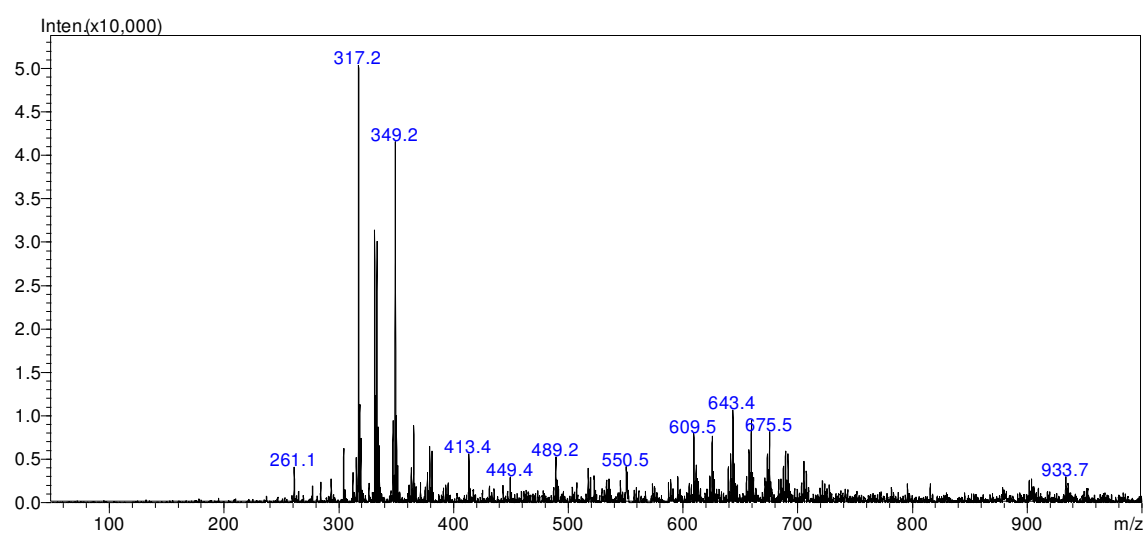
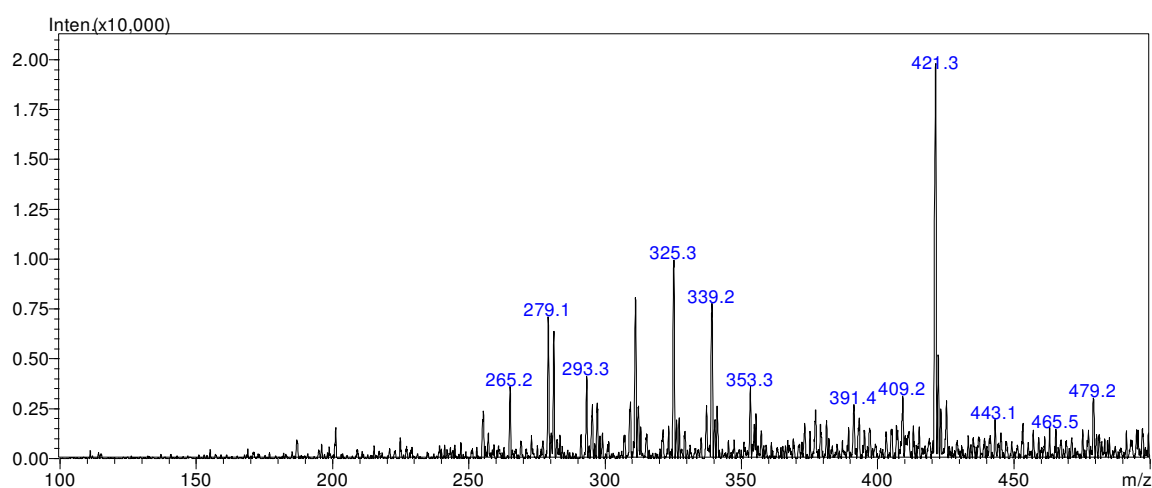
**Figura 24** – Espectro de massas da amostras OF obtido por EASI(+)-MS.

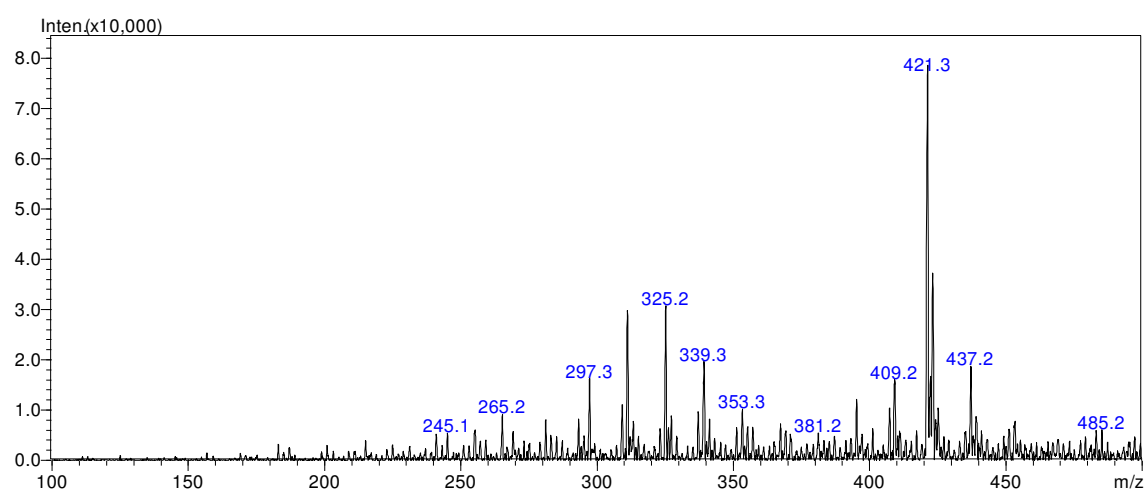
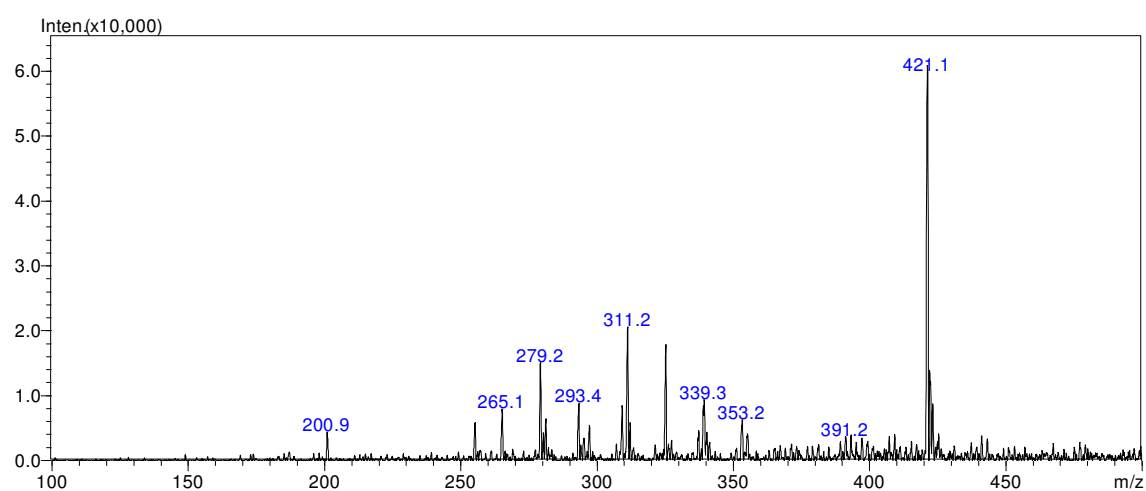


**Figura 25** – Espectro de massas da amostras EE obtido por EASI(+)-MS.





**Figura 26** – Espectro de massas da amostras OSA obtido por EASI(+)-MS.**Figura 27** – Espectro de massas da amostras OF obtido por EASI(-)-MS.

**Figura 28** – Espectro de massas da amostras EE obtido por EASI(-)-MS.**Figura 29** – Espectro de massas da amostras OSA obtido por EASI(-)-MS.

**Figura 30** – Sobreposição dos perfis cromatográficos das amostras de misturas de ésteres brutas, da fração apolar e da fração dos contaminantes obtidas pelo método otimizado de cromatografia em coluna aberta.

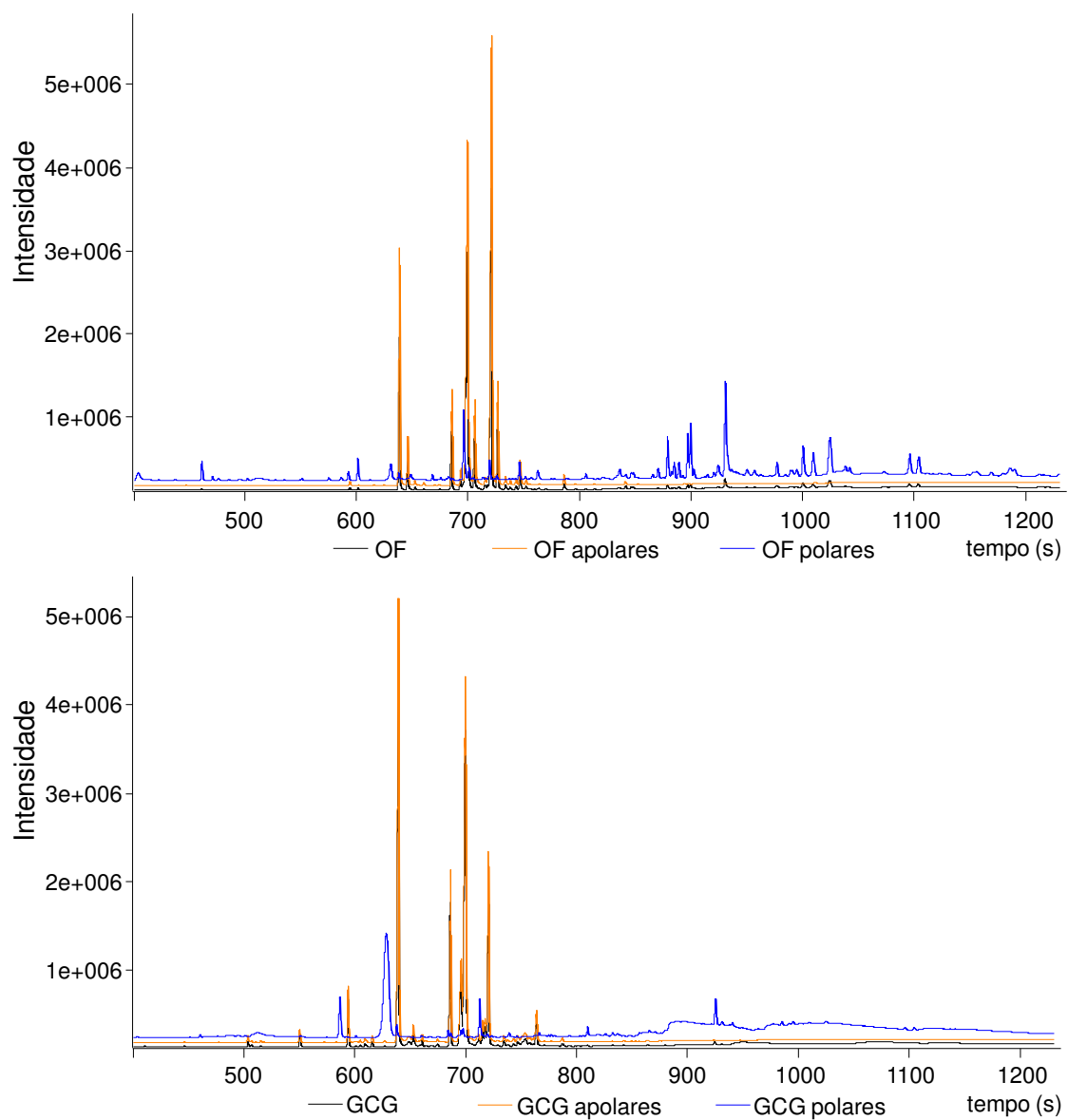


Figura 30  
Continuação

